



Evolução das características físico-químicas e da maturação em Queijo Amarelo e Queijo Picante da Beira Baixa DOP: - Composição, fracções azotadas e ácidos gordos livres.

Paula Alexandra Cardoso Gomes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Alimentar

Orientador: Professor Doutor António Louro Martins

Co-orientador: Doutora Ana Maria Carvalho Partidário

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria Isabel Nunes Januário, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutor António Pedro Louro Martins, Professor Auxiliar Convidado do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Ana Maria Carreira Pereira Carvalho Partidário, Investigadora Auxiliar do Instituto Nacional de Recursos Biológicos, I.P.

Lisboa, 2011

AGRADECIMENTOS

No culminar desta etapa quero expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram e tornaram possível a realização deste trabalho. Pelo apoio particularmente relevante justifica-se uma referência especial:

Ao Professor António Martins, na qualidade de orientador, pelo empenho demonstrando desde o primeiro dia ao nível da escolha do tema, bem como pela transmissão de conhecimentos, pelo grande rigor científico, pela exigência, pela constante cedência de documentação bibliográfica, pela leitura crítica, orientação e correcção do texto escrito.

À Doutora Ana Partidário, pelo precioso incentivo e pelo apoio científico na realização das análises efectuadas, pela cedência de documentação bibliográfica e leitura crítica do texto escrito. Não esquecendo o Dr. Rui Miranda, Eng.^a Margarida Duthoit, Eng.^a Cristina Serrano, Dona Gracinda Manuel, Dona Luísa Oliveira, Eng.^a Cristina Saldanha, Senhor Nelson Rodrigues pelo apoio constante e ajuda durante as análises.

A todos os colaboradores da DAMAR pela amabilidade, em especial à Dona Adriana e à Engenheira Ana pelo apoio, documentação fornecida e disponibilidade, pelo fornecimento das amostras que fizeram parte integrante deste estudo.

A todos os meus amigos, Tânia Matos, Maria Carreira, Romeu Santos, Sara Silva, Samuel Tomás, em especial ao João Reis, pelo apoio e incentivo ao longo do trabalho.

A toda à minha família, em especial aos meus pais e avós a quem tudo devo e que sempre se sacrificaram para me dar o melhor, pelo encorajamento e amor permanentes.

A todos, **MUITO OBRIGADA.**

RESUMO

Neste trabalho foi efectuada a monitorização da evolução das características físico-químicas de queijo representando duas das Denominações de Origem Protegida de queijo da Beira Baixa, Queijo Amarelo e Queijo Picante, produzido numa unidade de produção reconhecida para o efeito, complementada pelo estudo da evolução de alguns índices caracterizadores da maturação.

Neste contexto uma das prioridades foi o estudo e comparação de duas técnicas analíticas para determinação de ácidos gordos livres. Esta selecção baseou-se fundamentalmente nas percentagens de recuperação obtidas para diferentes ácidos gordos livres pelos dois métodos em estudo.

As amostras de Queijo Amarelo foram recolhidas aos 5, 30 e 45 dias, e para o Queijo Picante foram recolhidas aos 45, 90 e 120 dias.

Com base nos resultados obtidos para a evolução das características físico-químicas, fracções azotadas e ácidos gordos livres do queijo, pode acompanhar-se a evolução dos conjuntos de reacções mais importantes na maturação do queijo, glicólise, proteólise e lipólise, tendo sido obtidos resultados que demonstram diferenças entre o Queijo Amarelo e Queijo Picante. Os resultados obtidos tendem a evidenciar diferenças acentuadas para os resultados disponíveis na bibliografia, mostrando um possível efeito na composição de queijo da evolução verificada no fabrico relativamente à época dos estudos referidos.

Palavra-chave: Queijo Picante, Queijo Amarelo, Maturação, Proteólise, Ácidos gordos livres.

ABSTRACT

This work was carried out to monitor the evolution of the physicochemical characteristics of cheese represent two of the Protected Designation of Origin (PDO) from “Beira Baixa” cheese, the Amarelo cheese and Picante cheese, produced in a plant recognized its production. This assessment was complemented by studying the evolution of some parameters characterizing the maturation.

In addition to the assessment of physical and chemical characteristics of the cheese used in the definition contained in the regulations of the PDO, based on levels of fat and moisture, parameters such as acidity, pH, nitrogen fractions were considered as well as some relationships between them, as features of characterization of the cheese ripening. Some parameters were also used to characterize the ripening-related metabolism of fat and lactate (acidity of the fat and free fatty acids), important aspects with regard to sensory characteristics of cheese, which are much less used in the characterization of these products, often because the complexity involved in their analytic determination.

This study describes two analytical techniques (the method of salts and the method of resin) applied to the determination of free fatty acids in the “Beira Baixa” PDO (protected designation of origin) cheeses, Amarelo cheese and Picante from cheese in order to choose the best suited to achieving the best analytical results. This selection was based primarily on the recovery rates obtained for the different acids studied by two methods.

The assessment of physical and chemical characteristics was also made along the ripening period in Picante Cheese and Amarelo Cheese.

The samples were collected at 5, 30 and 45 days for Amarelo Cheese and at 45, 90 and 120 days for Picante cheese.

Based on the results obtained during the evolution of the physicochemical characteristics and free fatty acids, the evolution of glycolysis, proteolysis and lipolysis monitored. The results showed the differences between the Amarelo cheese and Picante cheese. Considering previous date, the results suggest that the recent production technologies could generate differences on cheese properties.

Keyword: Picante Cheese, Amarelo Cheese, Cheese ripening, Proteolysis, Free fatty acids.

ÍNDICE GERAL	
AGRADECIMENTOS	I
RESUMO	II
ABSTRACT	III
ÍNDICE DE QUADROS	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	V
ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO	1
PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
CAPÍTULO 1 – Matéria-prima – o leite.....	3
CAPÍTULO 2 - Transformação de leite em queijo.....	8
2.1. – Coagulação	8
2.2. – Maturação.....	10
2.2.1– Glicólise	11
2.2.2 - Proteólise.....	12
2.2.3 – Lipólise	13
CAPÍTULO 3 – Ácidos gordos	15
3.1 – Ácidos gordos saturados.....	15
3.2 – Ácidos gordos insaturados	16
3.2.1 – Ácidos gordos monoinsaturados.....	17
3.2.2 – Ácidos gordos polinsaturados.....	18
3.2.3 – Ácidos gordos de cadeia ramificada	18
CAPÍTULO 4 – Queijos da Beira Baixa - DOP	19
4.1 – Queijo Amarelo da Beira Baixa – DOP	19
4.1.1 - Caracterização.....	19
4.1.2 – Tecnologia de fabrico.....	19
4.2 – Queijo Picante da Beira Baixa – DOP	22
4.2.1 – Caracterização.....	22
4.2.2 - Tecnologia de fabrico.....	22
PARTE II- PARTE EXPERIMENTAL.....	24
CAPÍTULO 5 – METODOLOGIAS ANALÍTICAS	24
5.1 - Amostras de queijos	24
5.2 – Metodologias usadas na caracterização físico-química das amostras.....	26
5.3. – Determinação dos ácidos gordos livres	27
5.3.1 – Métodos de extracção e preparação das amostras para determinação dos AGL	27
5.3.2 – Métodos de Determinação	30
5.3.3 – Validação do método de extracção dos ácidos gordos livres.....	31
CAPÍTULO 6 - Resultados e discussão	33
6.1. – Monitorização da evolução do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP	34
6.2. – Monitorização da evolução do Queijo Picante da Beira Baixa DOP	44
CAPÍTULO 7 - Conclusões	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ÍNDICE DE QUADROS

Quadro I - Composição média do leite de duas espécies animais.	5
Quadro II - Frações caseínicas em percentagem da caseína total.	7
Quadro III - Significado dos códigos atribuídos às amostras de Queijo Amarelo.	25
Quadro IV - Significado dos códigos atribuídos às amostras de Queijo Picante.	25
Quadro V - Taxa de recuperação (%) dos métodos utilizados.	30
Quadro VI - Composição média do Queijo Amarelo.	34
Quadro VII - Resultados médios obtidos para os índices de maturação do Queijo Amarelo.	35
Quadro VIII - Valores dos ácidos gordos livres voláteis em mg AGL/kg amostra.	38
Quadro IX - Valores dos ácidos gordos livres saturados em mg AGL/kg amostra.	40
Quadro X - Valores dos ácidos gordos livres insaturados em mg AGL/kg amostra.	42
Quadro XI - Composição média do Queijo Picante.	44
Quadro XII - Resultados médios obtidos para os índices de maturação do Queijo Picante.	45
Quadro XIII - Valores dos ácidos gordos livres voláteis em mg AGL/kg amostra.	48
Quadro XIV - Valores dos ácidos gordos livres saturados em mg AGL/kg amostra.	50
Quadro XV - Valores dos ácidos gordos livres insaturados em mg AGL/kg amostra.	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura da micela de caseína adaptado de Alvarenga, 2008.	6
Figura 2 - Modelo em corte da micela de caseína adaptado de Alvarenga (2008).	9
Figura 3 - Fases de produção do Queijo Amarelo da Beira Baixa – DOP.	21
Figura 4 - Fases de produção do queijo Picante da Beira Baixa – DOP.	23
Figura 5 - Esquema elucidativo dos ensaios efectuados e recolha de amostras.	24
Figura 6 - Evolução da composição média do Queijo Amarelo.	35
Figura 7 - Evolução do pH e da Acidez ao longo da maturação do Queijo Amarelo.	36
Figura 8 - Evolução do coeficiente de maturação (CM), no Queijo Amarelo.	37
Figura 9 - Evolução dos índices de maturação médios no Queijo Amarelo.	37
Figura 10 - Evolução dos ácidos gordos voláteis (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.	39
Figura 11 - Evolução dos ácidos gordos saturados (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.	41
Figura 12 - Evolução dos ácidos gordos insaturados (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.	43
Figura 13 - Evolução da composição média no Queijo Picante.	45
Figura 14 - Evolução do pH e da Acidez ao longo da maturação do Queijo Picante.	46
Figura 15 - Evolução do coeficiente de maturação (CM), no Queijo Picante.	47
Figura 16 - Evolução dos índices de maturação médios no Queijo Picante.	47
Figura 17 - Evolução dos ácidos gordos voláteis (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.	49
Figura 18 - Evolução dos ácidos gordos saturados (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.	51
Figura 19 - Evolução dos ácidos gordos insaturados (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.	53

ENQUADRAMENTO E OBJECTIVOS DO TRABALHO

No nosso País, a designação de alguns produtos alimentares conduz-nos a uma região, às suas gentes e frequentemente a um modo característico de produção. Tem-se registado nos últimos anos um interesse crescente em termos científicos e tecnológicos por produtos alimentares tradicionais manufacturados artesanalmente. Tal interesse deve-se por um lado à sua história e às características organolépticas únicas de tais produtos e por outro, a uma grande dificuldade em imitá-los ao nível da produção em grande escala, dadas as particularidades do fabrico designadamente a utilização de leite cru. Tal é o caso de diversos queijos feitos com leite cru de pequenos ruminantes, e em particular dos provenientes da Beira Interior (Reis *et al.*, SD).

O queijo Amarelo da Beira Baixa e o queijo Picante da Beira Baixa são queijos da Beira Interior que beneficiam de uma Denominação de Origem Protegida (DOP), acreditando-se que, devido ao modo como são produzidos possuem características organolépticas únicas. No entanto, tal como em outras DOPs no nosso País são produtos cujo modo de produção se tem vindo a adaptar à evolução dos tempos, nomeadamente por questões relacionadas com a rentabilidade do modo de produção, em muitas situações com um impacto pouco positivo nos produtos nomeadamente nas suas características típicas (Martins *et al.*, 2000; Martins e Vasconcelos 2003/2004). Como se pode deduzir de muitas das descrições do modo de produção dos queijos tradicionais, por exemplo no caso dos queijos da Beira Baixa (Carneiro, 1999) as diferenças para hoje são, por vezes, substanciais e podem ter real impacto nas características dos produtos finais. Na verdade as modificações introduzidas nem sempre se revelam eficazes por não acautelarem a manutenção dos factores geradores dessa mesma tipicidade (Bertozzi e Pannari, 1993; Bertozzi, 1995; Martins *et al.*, 2000; Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

A queijaria tradicional mantém como suporte quer propositadamente quer por limitações estruturais, diversos factores de variabilidade. Mantém-se a utilização do leite cru predominantemente proveniente de pequenos ruminantes, em lotes relativamente reduzidos, produção muito marcada pelos sistemas tradicionais da produção animal. Esta opção tem hoje como base, a ideia de que toda a riqueza físico-química e biológica é um factor de qualidade/tipicidade do produto final, sendo considerada como elo fundamental de ligação do produto às regiões, garantindo que muitos dos aspectos físico-químicos e microbiológicos que podem ser determinados pelas condições específicas de cada região se possam exprimir no produto final. Incluímos aqui factores como a espécie produtora e eventualmente a raça, bem como os sistemas de produção, factores que alguns estudos apontam como relevantes a nível do produto, estando ainda por esclarecer a sua influência a nível dos nossos queijos (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

É sabido que, as características do queijo dependem de inúmeros factores associados quer à matéria-prima, às suas características de composição e microbiológicas, quer aos métodos e práticas de fabrico (Martins e Vasconcelos, 1993; Bertozzi, 1995; Martins e Vasconcelos, 2001). No queijo curado, a maturação desempenha um papel fundamental na evolução e definição das propriedades finais dos produtos. A proteólise, pela sua importância tem sido um dos conjuntos

de reacções mais estudadas, mesmo a nível dos queijos nacionais. O mesmo não acontece com as reacções metabólicas relacionadas com o metabolismo do lactato e com os fenómenos de lipólise.

Neste trabalho procurámos estudar a evolução dos ácidos gordos livres nos dois queijos DOP da região da Beira Baixa referidos, partindo de um trabalho prévio sobre a determinação de ácidos gordos livres em queijo, para cuja determinação em queijo existem poucas metodologias estabelecidas, tornando difícil o seu estudo e quantificação (Chairman, 1991).

Um dos objectivos deste trabalho foi assim, a validação de dois métodos (“método dos sais” e o “método das resinas”) de extracção e a determinação dos ácidos gordos livres em queijo, na perspectiva de obtenção de maior percentagem de recuperação.

A partir do método validado, o objectivo centrou-se no estudo da evolução dos ácidos gordos livres ao longo do processo da maturação do Queijo Amarelo e Queijo Picante da Beira Baixa. Em complemento destes objectivos foi efectuada a avaliação da evolução das propriedades físico-químicas, destes produtos, bem como a caracterização do Queijo Amarelo e Queijo do Picante produzidos na empresa.

PARTE I – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As regiões mediterrâneas, em particular Portugal, são caracterizadas pela existência de vários queijos artesanais fabricados a partir de leite de ovelha e cabra. Os queijos artesanais representavam, em 2007, 22% do total das vendas de queijo em Portugal, dos quais apenas 6% beneficiavam de uma denominação de origem protegida (DOP) (Reis e Malcata, 2007). Segundo o regulamento (CE) Nº 510/2006 de 20 de Março, uma denominação de origem é definida como o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício.

Presentemente para além do queijo Amarelo da Beira Baixa e do queijo Picante da Beira Baixa, é atribuída Denominação de Origem Protegida aos seguintes queijos portugueses: Queijo de Cabra Transmontano, Queijo Serra da Estrela, Queijo de Castelo Branco, Queijo Rabaçal, Queijo do Pico, Queijo Terrincho, Queijo de Nisa, Queijo São Jorge, Queijo de Azeitão, Queijo de Serpa, Queijo de Évora. Estão ainda protegidas pelo mesmo mecanismo o Requeijão Beira Baixa, e o Requeijão da Serra da Estrela (Gomes, 2009).

As características dos queijos são muito influenciadas pelas propriedades do leite utilizado na sua produção, dependendo estas de factores como a raça do animal e sua alimentação, ou ainda do clima, ou da época do ano e muito importante da tecnologia de produção (Canada, 1998).

CAPÍTULO 1 – Matéria-prima – o leite

A matéria-prima utilizada no fabrico dos mais afamados queijos tradicionais é o leite de pequenos ruminantes, estreme ou em misturas, sem ter sofrido qualquer tratamento térmico, isto é, leite cru. Este é porventura, o facto de maior relevância para este tipo de produtos, quer como factor da qualidade, quer como principal fonte de problemas para a tecnologia e para o produto (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

Devido à sua complexidade e heterogeneidade, o leite nem sempre apresenta a mesma aptidão para a transformação em queijo. Sendo a principal matéria-prima para o fabrico de queijo, é bem evidente que a sua composição quantitativa e qualitativa, nomeadamente no que se refere à riqueza em componentes úteis para o fabrico (fracção lipídica e fracção proteica-caseínas, presença de um bom equilíbrio mineral relativamente à proteína-cálcio, fósforo, fundamentais no processo de coagulação enzimática), bem como a sua qualidade microbiológica, irão condicionar fortemente todo o processo tecnológico, nomeadamente no que diz respeito ao rendimento e à qualidade do produto final obtido (Baião, 2007).

A acidez e o pH encontram-se normalmente associados à qualidade higiénica do leite e ao grau de frescura do mesmo, fornecendo indirectamente algumas indicações sobre as condições inerentes à produção e conservação do leite, bem como ao estado sanitário dos animais. Estes parâmetros condicionam em certa medida o decurso do processo tecnológico de fabrico, as características reológicas do gel, a estrutura e a textura do produto final. O pH é considerado um

dos factores mais importantes na coagulação enzimática dos leites de vaca, cabra e ovelha, sendo a sua influência sentida sobretudo a nível do tempo de coagulação e da consistência do gel. Entende-se por tempo de coagulação o período decorrido entre a adição do agente coagulante e o início de floculação do leite (Vieira Dias *et al.*, 2008).

A preparação do leite para o fabrico de queijo deve ser orientada em função dos objectivos que se pretendem atingir. O grande desafio estará em conseguir um produto acabado de características físico-químicas, microbiológicas e organolépticas sempre constantes, com o menor custo possível, partindo de uma matéria-prima base extremamente variável ao longo do tempo (Miranda, 1998). Como já foi referido há diferenças na produção dos queijos tradicionais, uma delas é a refrigeração do leite antes do fabrico. É sabido que a utilização da refrigeração em condições deficientes pode tornar-se uma fonte potencial de problemas para o fabrico do queijo, pois é susceptível de alterar completamente o equilíbrio da flora microbiana do leite, favorecendo o desenvolvimento dos psicotróficos, agentes de graves problemas na evolução e na qualidade do queijo, os quais apenas têm sido evidentes nos últimos anos, sendo inesperados e até desconhecidos para a grande maioria dos agentes transformadores. Também a refrigeração prolongada é problemática sob o ponto de vista físico-químico e tecnológico (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

Através de uma simples observação, é possível verificar que o leite de ovelha apresenta uma cor branca nacarada, ou de porcelana, e que as suas opacidades e viscosidade são maiores que o leite de cabra, factos estes que são intimamente ligados ao facto de ser um leite mais rico e concentrado. A riqueza do leite de ovelha é também reconhecida quando este se destina ao fabrico de queijo pois, como se sabe, é particularmente rico em componentes queijeiros (Carneiro, 1999).

Segundo Mens (1985), o leite de cabra apresenta uma cor branco-mate, tem um sabor adocicado, por vezes algo salgado, agradável, característico. Quando ordenhado de fresco possui um sabor mais neutro mas, em contrapartida, depois de armazenado no frio, adquire um sabor característico.

A composição físico-química não só difere de espécie para espécie mas também varia dentro de cada espécie devido a: diferentes raças, fisiologia individual, alimentação em quantidade e em qualidade, estado de lactação, quantidade de leite produzido, estação do ano, idade e o estado de saúde (Rebelo, 1994).

No Quadro I, é apresentada a composição média de duas espécies utilizadas na produção de queijo.

Quadro I - Composição média do leite de duas espécies animais.

Designações	Ovelha	Cabra
Água	86	90
Gordura	7,5	4,5
Proteína	5,6	3,3
Lactose	4,4	4,6
Sais minerais	0,93	0,85

Fonte: Adaptado de Rebelo, 1994

Tão ou mais importante do que a proporção dos diferentes componentes, é a composição dos mesmos, designadamente da gordura e da proteína, dois dos componentes maiores e de maior complexidade.

De todos os componentes do leite, a fracção que mais varia é a matéria gorda, oscilando a sua concentração entre 3,2% e 6%. Como já foi referido anteriormente existem factores que influenciam as concentrações lipídicas do leite. Apesar destas variações podem extrair-se algumas conclusões gerais; assim, os lípidos apolares constituem aproximadamente 98,5% do total, e os polares restantes 1,5% (Ramos e Juaréz, 1986).

A importância da gordura na qualidade do queijo pode considerar-se a partir de três pontos de vista: como suporte nutricional, pela sua influência nas características estruturais e reológicas do queijo, e pela sua participação na formação do aroma (Nájera *et al.*, 1993).

Os triacilgliceróis são os componentes maioritários da gordura do leite de todas as espécies, constituindo mais de 95% do total de lípidos. São sempre acompanhados por pequenas quantidades de di- e monoglicéridos, colesterol livre e seus ésteres, ácidos gordos livres e fosfolípidos, assim como glicolípidos e outros componentes minoritários como vitaminas lipossolúveis.

O leite de ovelha, tal como no caso dos restantes ruminantes, possui uma elevada proporção de ácidos gordos com 4 a 12 átomos de carbono mas tal como no caso do leite de cabra, contém maior quantidade relativa de ácidos, caprónico (C6), caprílico (C8), cáprico (C10), e láurico (C12) (Ramos e Juaréz, 1986).

A composição dos ácidos gordos é muito influenciada por diferentes factores, principalmente pela alimentação, devido a este factor, os ácidos gordos livres embora alguns tenham pequenas variações (Anifantakis, 1986), há outros, como os de 4 a 12 átomos de carbono, que podem atingir variações elevadas da ordem de 128% (Assenat, 1985). As proporções relativas dos ácidos saturados de C4 (butírico) a C16 (palmítico) evoluem paralelamente, situando-se o máximo no início da lactação e o mínimo no final. Os ácidos esteárico (C18) e oleico (C18:1) seguem uma evolução inversa (Routaboul, 1981). Segundo Noble (1970), imediatamente a seguir ao parto o leite de ovelha contém concentrações muito elevadas de ácido oleico que, no final da lactação são menores, aumentando a proporção em ácidos de cadeia mais curta (C6 a

C14). A proporção de ácido linoleico (C18:2) vai aumentando ao longo da lactação.

Quanto à fracção proteica do leite utilizado no fabrico de queijo é um dos factores com maior influência no processo de coagulação, condicionando as características da coalhada e do produto final obtido. A concentração e a dimensão das micelas de caseína bem como a sua proporção relativa e ainda o teor de cálcio coloidal solúvel, são algumas das principais características físico-químicas inerentes ao leite que variam entre espécies e dentro da mesma espécie, dependentes da raça, sendo responsáveis pelas propriedades particulares aos queijos de vaca, de cabra e de ovelha. São também determinantes para o comportamento do leite durante a coagulação e para as características do gel, as quais podem condicionar o tipo de trabalho que a coalhada pode sofrer (Vieira Dias *et al.*, 2008).

Para entender a dinâmica de coagulação, bem como os processos ocorridos durante a cura, foi fundamental definir um modelo aceitável para o comportamento das moléculas de proteína bem como para as alterações que se vão verificando ao longo dos processos mais importantes durante a obtenção do queijo: a coagulação, a sinérese e a cura.

As moléculas de proteína encontram-se associadas em partículas que são conhecidas como micelas de caseína e contêm cerca de 80% da proteína do leite. A sua estrutura é coloidal, a forma pode ser considerada esférica e são compostas por várias moléculas agrupadas em diferentes tipos α_1 -, α_2 -, e caseínas k (Dalglish, 1999).

Em todos os modelos de organização estrutural conhecidos, a caseína k aparece na superfície da micela e desempenha um papel fundamental na estabilidade do coloide (Dalglish, 1999). Destes, o mais difundido é o de Schmidt proposto em 1982 e pode observar-se na Figura 1.

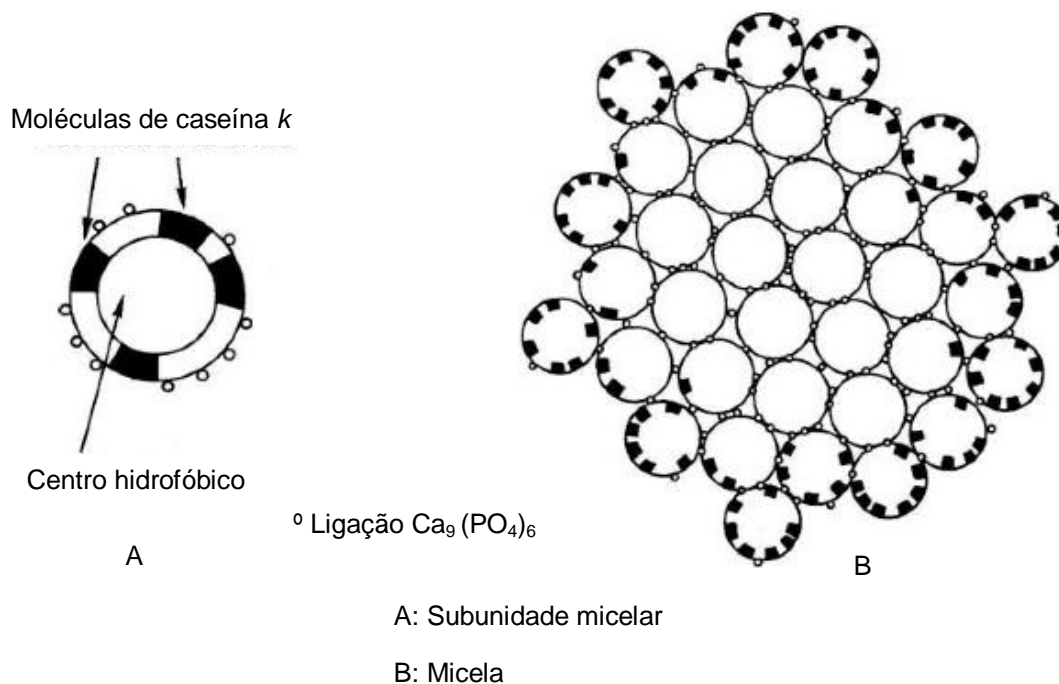


Figura 1 - Estrutura da micela de caseína adaptado de Alvarenga, 2008.

Estas subunidades agregam-se entre si por meio do cálcio e do fosfato mineral $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$, formando assim a micela. A agregação é favorecida pela presença dos resíduos fosfoeril situadas no exterior das submicelas, com efeito, estas apresentam uma grande afinidade relativamente ao cálcio e ao fosfato de cálcio.

As proporções relativas das caseínas nomeadamente da caseína k , variam consoante as submicelas. A área superficial ocupada pela componente polar da caseína k e, em seguida privada de locais de fixação dos elementos k , ou dela privadas, localizam-se no interior da micela, as ricas em caseína k encontram-se no exterior. Assim, o crescimento micelar está limitado naturalmente, parando quando a superfície da micela é formada sobretudo por caseína k (figura 1B) e a sua componente polar poderá ser projectada para o seio da parte aquosa (Brule e Lenoir, 1987).

No Quadro II são apresentados os teores das diferentes fracções da caseína nos leites de ovelha e cabra, e permite identificar diferenças quantitativas e qualitativas importantes, as quais segundo vários autores (Ramos e Juaréz, 1986) têm sido utilizadas na detecção de misturas de leites de diferentes espécies.

Quadro II - Fracções caseínicas em percentagem da caseína total.

Fracções Caseínicas	Leite de cabra	Leite de ovelha
α_{s1}		15,5
		30,2
α_{s2}	12,6	14,7
β_1	35,9	18,9
	75,3	47,1
β_2	39,4	28,2
k	8,1	7,3
γ	3,9	15,4

Fonte: Adaptado de Martins (1989)

Da leitura deste quadro pode observar-se que, em média, a percentagem de caseínas α_s é nitidamente mais elevada no leite de ovelha. O teor em caseínas β é proporcionalmente maior no leite de cabra. Estas diferenças na distribuição das várias fracções da caseína são bastante importantes, já que podem ser relacionadas com a grande variedade de aspectos e de comportamentos observados nas micelas das diferentes espécies (Richardson, 1974). Por outro lado, segundo Assenat (1985), o baixo teor em caseínas α_s nos leites de ovelha e cabra contribuem para a menor frequência ou mesmo ausência de sabores amargos no queijo. Anifantakis (1986) acrescenta que as diferentes proporções das caseínas influenciam quer o

tempo de coagulação por acção de enzimas quer a firmeza da coalhada, sendo a coagulação mais rápida e com uma coalhada muito mais firme no que toca ao leite de ovelha.

CAPÍTULO 2 - Transformação de leite em queijo

O fabrico de queijo pode envolver diversas fases, que vão desde a preparação da matéria-prima até ao acabamento final do queijo, sendo a coagulação o fenómeno central tal como o dessoramento resultante da sinérese, sendo por isso tratadas em pormenor a seguir.

Nem todas as fases se usam ou se promovem da mesma maneira ou com a mesma intensidade em todos os queijos e, por isso, a diversidade é grande. Uma das fases que pode existir é a cura, muito complexa mas muito importante na determinação das características finais do queijo, pelo que é também tratada com pormenor a seguir.

2.1. – Coagulação

A coagulação do leite que se traduz pela formação de um gel, resulta das modificações físico-químicas que intervêm ao nível das micelas de caseínas; os mecanismos propostos na formação do coágulo diferem totalmente, conforme estas modificações sejam introduzidas por acidificação ou pela acção das enzimas coagulantes (Brule e Lenoir, 1987).

A coagulação enzimática da proteína do leite ocorre em duas fases e pode ser efectuada por meio de enzimas de origem animal, vegetal e microbiana predominantemente proteases ácidas ou aspárticas (Alvarenga, 2008).

A coagulação do leite pela acção de enzimas coagulantes tem lugar em duas fases, a fase primária que se designa por enzimática, durante a qual o coagulante ataca o componente estabilizador da micela e a fase secundária, fase de coagulação, que corresponde à formação do gel, por associação das micelas modificadas pela acção das enzimas (Brule e Lenoir, 1987).

Na primeira fase o coagulante promove um corte na ligação peptídica existente entre a posição 105 e 106, constituída pelos aminoácidos fenilalanina e metionina da caseína *k* (Phe₁₀₅–Met₁₀₆). A enzima que apresenta maior especificidade para quebra desta ligação, a quimosina, é de origem animal. Esta acção divide a caseína *k* em duas fracções: o glicomacropéptido (GMP), solúvel, hidrofílico, constituído pelos aminoácidos 106-169, o qual fica no soro, e a fracção para-caseína *k*, insolúvel, hidrofóbica, constituída pelos aminoácidos 1-105, a qual permanece ligada às caseínas α_{S1} e β e por ser altamente hidrofóbica e alcalina, conduz à destabilização das micelas (Dalglish, 1999). É uma fase puramente enzimática ao longo da qual não se notam modificações macroscópicas no leite, até que seja atingida uma proporção significativa da caseína *k* (85-90%), implicando uma desestabilização micelar tal que permite que as restantes caseínas, sensíveis ao cálcio, iniciem um processo de agregação micelar captando o cálcio iónico disponível na solução, indispensável, portanto, para que se verifique a coagulação (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

A fase secundária é facilmente observável num leite coalhado mantido à temperatura conveniente. Pode observar-se que a libertação do GMP e a sua passagem para o soro, conduz a uma importante diminuição da carga das micelas e provavelmente também o seu grau de hidratação. Por este motivo os dois factores de estabilidade encontram-se alcançados, portanto, podem estabelecer-se as ligações intramicelares que conduzem um aumento de viscosidade gradual devido à formação de uma estrutura de gel (Brule e Lenoir, 1987). Esta fase designa-se também por agregação micelar, é uma fase não enzimática, na qual intervêm processos físicos, constituída por uma malha de caseína cada vez mais resistente, a qual aprisiona os componentes do leite, quer solúveis, quer insolúveis, como a matéria gorda. Em simultâneo, o complexo enzimático vai actuando sobre as caseínas, mais ou menos intensamente em função das características das proteases presentes e das próprias caseínas (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

O modelo da micela de caseína que se apresenta na Figura 2, destaca a importância da fracção GMP e promove a sua disposição à superfície da micela conferindo-lhe um aspecto filamentososo (Alvarenga, 2008).

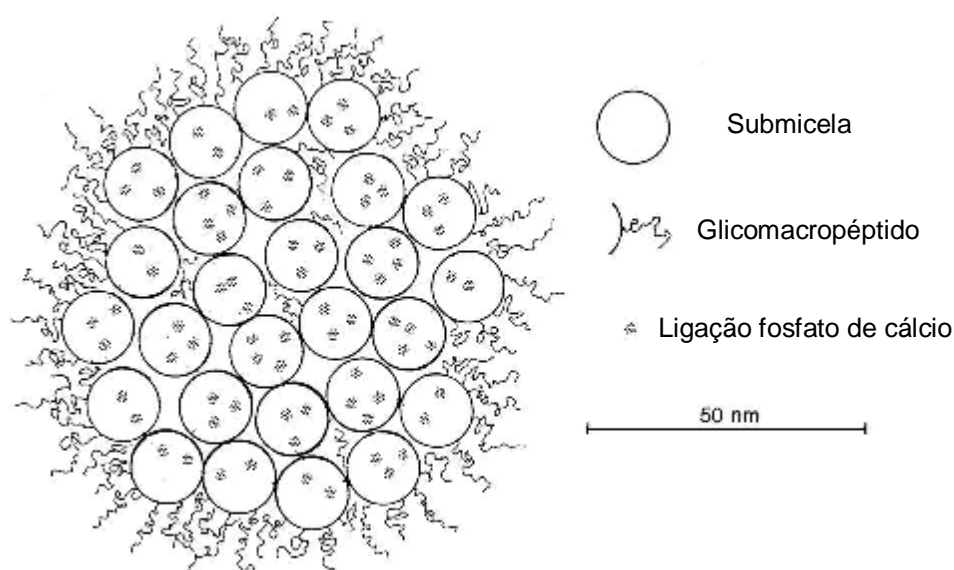


Figura 2 - Modelo em corte da micela de caseína adaptado de Alvarenga (2008).

Na segunda fase da coagulação as micelas modificadas tendem a agregar-se e a formar uma rede, inicialmente débil, que vai aprisionando os glóbulos de gordura, a água e os materiais solúveis em água. A agregação corresponde à formação do gel pela associação de resíduos de micela modificados e é altamente dependente do pH, da temperatura, dos teores em cálcio e em caseína. Uma subida nestes três últimos factores provoca uma diminuição no tempo de coagulação e um aumento na firmeza do gel (Lopez *et al.*, 1998).

No estado nativo cerca de 80% das caseínas no leite estão associadas entre si e com fosfato de cálcio para formar formas coloidais dispersas de micelas de caseína (Tziboula, 1999), e a

maioria dos autores é unânime relativamente à importância decisiva das ligações fosfato de cálcio na agregação das micelas. O número destas ligações aumenta com a concentração de Ca^{2+} no meio mas por outro lado diminui com o decréscimo do pH, pois o nível de fosfato de cálcio coloidal decresce e este começa a solubilizar a pH inferior a 5,8 (Karlsson *et al.*, 2007).

A agregação de micelas de caseína forma uma estrutura constituída por cordões com cerca de três unidades micelares de largura e dez de comprimento, alternados por alguns nódulos de unidades micelares. Estes cordões começam a crescer e a ocupar o volume do recipiente e o gel começa a formar-se (Green, 1999). A rede entretanto formada é irregular e tem bastantes poros de vários micrómetros de largura. Posteriormente, as partículas começam a agregar-se em cadeias cada vez maiores que começam a ramificar e, por fim, formam a estrutura de gel assumida pela rede proteica conhecida como coalhada (Alvarenga, 2008).

Devido à natureza dos poros e a dinâmica de formação das cadeias, a coalhada tem tendência a contrair provocando a exsudação do líquido. Este fenómeno é conhecido por sinérese (Alais, 1985), corresponde à expulsão espontânea de soro acompanhando o aumento de rigidez do gel, o qual, a partir de certo momento tem condições para sofrer intervenções físicas externas, como o corte, de modo a acelerar a saída do soro, completando-se posteriormente o ciclo de fabrico (Martins e Vasconcelos, 2003/2004). A sinérese depende de vários factores como o tratamento térmico, a homogeneização do leite, a quantidade de sais como cloreto de cálcio e cloreto de sódio, a quantidade de agente coagulante, a temperatura de coagulação, o pH e o uso de práticas como corte e lavagem da coalhada (Walstra, 1999). O controlo da sinérese permite aos produtores de queijo controlar a humidade final e a actividade da água (a_w) da coalhada fresca e, assim, exercer influência determinante na dinâmica do processo de maturação. Durante a fase inicial da cura observa-se um abaixamento do pH que fomenta o aumento da sinérese, devido a reajustes nas ligações proteína-proteína no gel de caseína (Walstra, 1999).

2.2. – Maturação

O processo de maturação (ou cura) corresponde a uma fase de digestão enzimática da coalhada. Com a coagulação e o dessoramento, assegura-se a presença de um substrato essencialmente constituído por caseínas, matéria gorda e uma fracção dos componentes solúveis do leite. Este substrato encontra-se povoado por microrganismos e durante a cura os seus constituintes são transformados, devido à acção de enzimas originalmente presentes na coalhada ou elaborados durante a cura por sínteses microbianas (Choisy *et al.*, 1987). A cura é o culminar de todo o processo e deverá decorrer em condições que permitam as complexas reacções que ajudam a definir as características finais do queijo, numa extensão correcta e adequada, dificultando em simultâneo a actuação dos agentes perniciosos (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

A composição básica e a estrutura da rede proteica são condicionadas pelas operações de

obtenção da coalhada. Contudo a maturação tem um papel fundamental no desenvolvimento das características individuais de cada queijo. Apesar de haver algumas variedades de queijos que são consumidas em fresco, a maioria são consumidas após um período de maturação que pode ir dos trinta dias até mais de dois anos. Durante este período ocorrem três eventos bioquímicos primários: o metabolismo da lactose, o metabolismo das proteínas e o metabolismo dos lípidos, conhecidos por glicólise, proteólise e lipólise, respectivamente. Estas reacções primárias são as responsáveis pelas alterações ocorridas durante a cura que mais determinam a textura e o desenvolvimento do *flavour* básico dos queijos. No entanto, numerosas modificações secundárias ocorrem paralelamente e não só são responsáveis pelo desenvolvimento dos aspectos finos do *flavour*, como também contribuem para modificar a textura. Estes fenómenos complexos afectam todos os compostos solúveis e insolúveis da matriz e são devidos à acção das enzimas do agente coagulante, dos microrganismos e, com menor importância, das enzimas nativas do leite (Fox *et al.*, 1999).

Os agentes de cura têm diversas origens, o leite, o coalho, os microrganismos que se encontram na pasta, estes últimos podem provir do leite, das leveduras, da atmosfera nos locais de fabrico, do material de queijaria, pertencendo a espécies e a grupos muito diferentes (Choisy *et al.*, 1987).

O tipo de leite usado é um dos factores mais importantes na maturação de queijo devido à presença de microrganismos de diferentes géneros. Em queijos obtidos a partir de leite cru os microrganismos dominantes, durante a cura, são bactérias lácticas dos géneros *Lactobacillus*, *Lactococcus* e *Enterococcus*. Pensa-se que estas bactérias sejam as principais responsáveis pelo desenvolvimento dos aromas ao longo da cura e, enquanto estas crescem, as leveduras, enterobactérias e estafilococos diminuem drasticamente para valores residuais. No final da cura, estas bactérias lácticas prevalecem e controlam a proliferação de microrganismos indesejáveis (Dahl *et al.*, 2000).

A diversidade da microflora contribui para a complexidade do processo, pois com as espécies em associação são frequentes os efeitos de sinergia ou de oposição. Por outro lado, esta microflora evolui, algumas espécies desenvolvem-se e outras tendem a desaparecer, não existe um equilíbrio microbiano estável, mas antes uma sucessão de floras com sequências de aparecimento e desaparecimento comandadas pela própria evolução do substrato (Choisy *et al.*, 1987).

2.2.1– Glicólise

Grande parte da lactose é extraída com o soro durante a produção de queijo, apesar de permanecer sempre uma quantidade de lactose residual dissolvida no soro existente nos poros da matriz da coalhada. Esta é rapidamente convertida em ácido láctico pela acção das bactérias lácticas. A acidificação do meio tem um efeito importante na estrutura da matriz proteica, por via

da desmineralização das micelas de caseína (Lawrence *et al.*, 1987). O metabolismo de lactose residual completo e extenso é essencial para a produção de queijos de boa qualidade e a sua rapidez depende entre outros factores, da quantidade de sal existente na coalhada, uma vez que as bactérias lácticas de arranque são mais sensíveis ao sal do que as bactérias lácticas que não pertencem a esse grupo (Fox *et al.*, 1999).

Para além das bactérias lácticas, existem outros microrganismos capazes de fermentar os monossacáridos da lactose e transformá-los em diversos produtos, que podem ser indesejáveis e produzem defeitos no queijo. Por exemplo, os coliformes transformam a lactose em ácido láctico, ácido acético e em ácido fórmico, enquanto as leveduras transformam-na não só em ácidos orgânicos, mas também em álcool, acetaldeído e em dióxido de carbono (Dumais *et al.*, 1991).

O ácido láctico resultante da fermentação da lactose também sofre modificações. Por exemplo, pode combinar-se com o cálcio do soro para formar lactato de cálcio e, dependendo do tipo de queijo, o lactato e o ácido láctico podem ser fermentados em ácido propiónico (C3), ácido acético (C2) e dióxido de carbono (CO₂) (Dumais *et al.*, 1991).

A evolução do lactato é variável consoante o tipo das pastas. Nas pastas moles os bolores degradam-no rapidamente. A sua evolução é especialmente importante entre o quarto e o sétimo dia. A fermentação da lactose e do lactato durante a maturação intervém certamente nas qualidades organolépticas dos queijos (Choisy *et al.*, 1987).

2.2.2 - Proteólise

A matriz proteica sofre mudanças estruturais durante a cura. Em queijos recentemente coagulados, os agregados de caseína perdem a sua forma esférica devido aos fenómenos ocorridos durante a coagulação, passando a apresentar uma estrutura fibrosa conhecida como rede proteica. À medida que a cura avança, ocorrem processos de dissociação nas proteínas fibrosas, levando à formação de camadas com estrutura mais homogénea. O fenómeno responsável por esta alteração é a proteólise, que é o evento primário mais complexo que ocorre durante a maturação e o mais importante no desenvolvimento do perfil de textura e também de *flavour*, muitos autores pensam que a proteólise é mesmo a mais importante transformação que decorre durante a maturação dos mais variados tipos de queijo. A proteólise contribui para as alterações neste perfil de quatro formas diferentes: libertação de aminoácidos e péptidos, que podem estar directamente associados ao sabor amargo e, indirectamente através da via do catabolismo dos aminoácidos, pela formação de compostos que contribuem para o *flavour* como aminas, ácidos, tióis, tioésteres, entre outros (Alvarenga, 2008). Os ácidos provenientes do catabolismo dos aminoácidos são o ácido isobutírico (isoC4), ácido isovalérico (isoC5) e ácido valérico (C5) (Partidário, 1998).

As enzimas responsáveis pela proteólise podem agrupar-se em dois grupos principais: as

endoproteínases e as exopeptidases. As endoproteínases cortam as cadeias polipeptídicas em ligações peptídicas específicas no interior da cadeia, semelhante à especificidade da quimosina para a ligação Phe₁₀₅-Met₁₀₆ da caseína *k*. As exopeptidases hidrolisam um (ou alguns) aminoácido(s) de cada vez, em ambas as extremidades (N-terminal - aminopeptidases e C-terminal -carboxipeptidases) dos polipéptidos (Alvarenga, 2008). A proteólise é um fenómeno muito complexo, devido à diversidade das proteínas do leite e da flora microbiana existente e à variedade das enzimas proteolíticas que nela participam. Os principais contribuintes para o processo de proteólise são: o agente coagulante, as proteases e as peptidases do fermento láctico e/ou da flora secundária, bem como as enzimas naturais do leite (Grappin, 1985). A contribuição das enzimas não naturais do leite para a qualidade do queijo é controversa, pois as que provêm de *Lactobacillus*, *Pedococcus* e *Micrococcus* trazem efeitos negativos na qualidade do queijo, enquanto que, a maioria das enzimas contribui para a intensidade do *flavour* do queijo (Fox, 1989).

É comum subdividir a proteólise em dois tipos sequenciais: a proteólise primária ou extensão da proteólise, que indica até que ponto as caseínas estão hidrolisadas em péptidos solúveis em água, sendo medida a partir do quociente entre o azoto solúvel em água e azoto total (o coeficiente de maturação). A fracção solúvel em água é importante no desenvolvimento do *flavour* do queijo é geralmente relacionada com os aromas de fundo característicos do queijo (Rank, 1985). A proteólise secundária ou o grau de profundidade da proteólise, que mede até que ponto esses péptidos foram degradados em péptidos de pequenas dimensões, ou aminoácidos, podendo ser determinada a partir das relações entre o azoto não proteico ou o azoto aminoacídico e azoto total (Alvarenga, 2008). A extensão da proteólise em queijos obtidos a partir de agentes coagulantes vegetais é superior à de queijos obtidos a partir de coalho animal. Pelo contrário, o grau de profundidade da proteólise é semelhante em ambos os tipos de queijos. Assim, enquanto a extensão da proteólise depende das enzimas do agente coagulante, o grau de profundidade da proteólise depende das enzimas microbianas das bactérias lácticas (Fox, 1989).

2.2.3 – Lipólise

Uma das principais reacções bioquímicas que tem lugar durante a maturação do queijo, essencial para o desenvolvimento de aromas, é a lipólise (Ordóñez, 1987).

A lipólise é a hidrólise dos lípidos que ocorre por acção de lipases naturais do leite e de lipases de origem microbiana. A maior parte dos queijos têm uma actividade lipolítica muito ligeira durante a cura e muitos consumidores associam um elevado grau de ácidos gordos livres nos queijos ao sabor a ranço (Fox *et al.*, 1993). As enzimas lipolíticas podem ser classificadas como esterases ou lipases, que são diferenciadas de acordo com três características principais: comprimento da cadeia éster hidrolisado, natureza físico-química do substrato e da cinética enzimática (Chich *et al.*, 1997).

No queijo as lipases podem provir das seguintes fontes: do leite, do coagulante, das bactérias iniciais e de preparações de lipases exógenas (Deeth e Fitz-Gerald, 1995; Fox e Wallace, 1997; McSweeney e Sousa, 2000). Todos os microrganismos são susceptíveis de produzirem lipases em quantidades que variam consoante as espécies ou as linhagens. Os microrganismos mais lipolíticos são os bolores (Choisy *et al.*, 1987). O *P. camemberti* pode produzir grandes quantidades de lipase exocelular, sendo o principal agente da lipólise do queijo *Camembert*. Também a lipólise é muito mais intensa na parte superficial, onde pode atingir 30%, do que no centro do queijo. O *Geotrichum candidum*, que se desenvolve no início da cura, também pode contribuir para a hidrólise dos triglicéridos, assegurando sobretudo a libertação de ácido oleico (Choisy *et al.*, 1987).

Nos “queijos azuis” a lipólise resulta essencialmente da acção do *P. roqueforti*. A presença de duas lipases com especificidades diferentes contribui para diversificar o perfil dos ácidos gordos livres, dada a diferença das condições favoráveis à síntese e à acção destas enzimas, uma sendo favorecida pelos valores de pH ácidos, a outra pelos neutros.

As bactérias lácticas são pouco lipolíticas; os lactobacilos e o *Streptococcus thermophilus* têm fraca actividade, mas os estreptococos mesófilos e os *Leuconostoc* são, em geral, um pouco mais activos. No entanto, estes microrganismos são responsáveis pela lipólise dos queijos com flora essencialmente láctica, feitos com leite pasteurizado, e reforçam a acção da lipase natural do leite nos queijos de leite cru, pela sua aptidão na hidrólise dos di- ou os monoglicéridos (Choisy *et al.*, 1987).

No leite existem uma série de lipases naturais sensíveis à temperatura, sendo necessário um tratamento de 78 °C/10 s para a sua inactivação completa. Assim, queijos obtidos a partir de leite cru ou apenas submetido a tratamentos térmicos muito ligeiros estão sujeitos à acção destas lipases, que são específicas para a posição 3 do triglicérido, onde na gordura do leite o ácido butírico (C4) se encontra preferencialmente esterificado o que explica a concentração elevada deste ácido nalguns tipos de queijo (Fox *et al.*, 1999). Também lipases presentes no coelho animal contribuem para a hidrólise dos triacilgliceróis. Estas lipases apresentam uma actividade preferencial sobre as ligações éster com ácidos gordos de cadeia curta, sendo responsável pela libertação do ácido capróico (C6) (Partidário, 1998).

Um queijo com um reduzido teor de gordura não tem sabor típico e contém menos concentração de ácidos gordos livres do que um queijo com elevado teor de gordura, apoiando a teoria que os ácidos gordos livres são importantes para o *flavour* do queijo (Foda *et al.*, 1974; Oslon e Johnson, 1990; Dimos *et al.*, 1996; Wijesundera *et al.*, 1998).

Os ácidos gordos livres de cadeia longa (> 12 átomos de carbono) são considerados como tendo um desempenho menor no *flavour* do queijo, devido ao seu elevado limiar de percepção. Por sua vez os ácidos gordos livres de cadeia curta e intermédia (C4 – C12) têm limiares de percepção consideravelmente menores e cada um transmite uma nota de *flavour* característica. O ácido butírico (C4) conduz ao *flavour* a ranço quando em teores muito elevados e em alguns queijos é

considerado um *flavour* característico. O ácido capróico (C6) confere um *flavour* picante ao “queijo azul”, enquanto o ácido caprílico (C8) tem sido associado a *flavours* como sabão, cabra, ranço e frutado (Molimard e Spinnler, 1996).

CAPÍTULO 3 – Ácidos gordos

A importância dos ácidos gordos no contexto deste trabalho justifica a inclusão de um capítulo específico, onde se revêem alguns aspectos importantes da química e bioquímica dos mesmos embora já tenham sido feitas algumas referências anteriormente.

Ácido gordo designa qualquer ácido monocarboxílico alifático que possa libertar-se por hidrólise a partir de óleos ou gorduras naturais.

Os mais importantes e frequentes são os monocarboxílicos, de cadeia linear não ramificada, com número par de átomos de carbono (entre 4 e 30). Podem ser saturados, insaturados e, por vezes, hidroxilados (Campos, 2008).

Os ácidos gordos são, em geral, designados por um nome trivial (por exemplo: cáprico, láurico, palmítico, oleico). O nome sistemático dá informação acerca do comprimento da cadeia carbonada pela utilização de um prefixo grego, por exemplo, hexa-, para 6 átomos de carbono, dodeca -, para 12 átomos de carbono, etc. Os ácidos gordos saturados contêm todos o sufixo -anóico; os ácidos gordos insaturados contêm todos o sufixo -enóico, para uma ligação dupla, o sufixo -dienóico para duas ligações duplas e o sufixo -trienóico para três ligações duplas (Partidário, 1998).

Os ácidos gordos constituintes dos trigliceróis da gordura de leite de ruminantes podem ser agrupados em: saturados de cadeia curta (C4 e C6), saturados de cadeia média (C8, C10 e C12), saturados de cadeia longa (C14, C15, C16 e C18) e insaturados de cadeia longa (C14:1, C16:1, C18:1 e C18:2). Estes ácidos estão normalmente presentes em teores acima de 1% e constituem cerca de 95% do total de ácidos gordos. No caso específico do leite de ovelha, observam-se maiores teores de ácidos saturados de cadeia curta e média (C6 a C12), comparativamente com o leite de vaca (Partidário, 1998).

3.1 – Ácidos gordos saturados

Os ácidos gordos saturados mais comuns são os de cadeia linear, com número par de átomos de carbono e contendo 14 a 20 átomos de carbono na molécula. Aparecem contudo na natureza ácidos carboxílicos com 2 a 30 átomos na sua estrutura e com número ímpar de átomos de carbono (Partidário, 1998).

O ácido acético (C2) não é frequentemente encontrado sob a forma esterificada, em associação com ácidos de maior massa molecular. Aparece na forma éster de glicerol, normalmente em hidroxiglicéridos, em sementes de algumas oleaginosas e leite de ruminantes (Christie, 1987).

Os ácidos de C4 a C12, encontram-se principalmente em gorduras de leites, se bem que os

ácidos C8 (caprílico), C10 (cáprico) e C12 (láurico) também apareçam, em quantidades razoáveis, em alguns óleos de semente (Partidário, 1998).

O ácido mirístico (C14) é um componente pouco importante na maioria dos lípidos animais, com exceção para os ruminantes onde constitui cerca de 3-4% da composição em ácidos gordos do sebo, atingindo valores mais elevados na gordura dos referidos leites (8-12%). Este ácido gordo aparece também nos óleos de coco e palmiste (Markley, 1960).

O ácido palmítico (C16) é o ácido gordo saturado mais comum, aparecendo praticamente em todas as gorduras vegetais e animais. O ácido esteárico (C18) é também bastante comum e é geralmente abundante em lípidos complexos (Christie, 1987). O ácido araquídico (C20) encontra-se largamente distribuído na natureza, mas é geralmente um componente menor na maioria das gorduras.

Os ácidos gordos com número ímpar de átomos de carbono aparecem em muito pouca quantidade na natureza.

O ácido propiónico (C3) aparece em leite e produtos lácteos, normalmente sob a forma não esterificada e como resultado de fermentações microbianas.

Os ácidos, valérico (C5) e heptanóico (C7) para além de poderem estar presentes na gordura de leite e produtos lácteos, podem também encontrar-se na forma de ésteres em alguns óleos essenciais e essências de frutos.

O ácido pelargónico (C9) para além de presente em gordura de leite e na gordura de cabelo humano, aparece também no reino vegetal em óleos essenciais, derivando o seu nome da sua presença em óleo de *Pelargonium roseum* (Christie, 1987).

Os ácidos undecanóico (C11) e tridecanóico (C13), estão presentes em leite e produtos lácteos em quantidades reduzidas. O ácido undecanóico aparece, no entanto, em quantidades um pouco superiores em leite de ovelha. Estes ácidos encontram-se também em gordura de cabelo humano e em óleo de íris (Christie, 1987).

Os ácidos pentadecanóico (C15) e margárico (C17) aparecem em leites de diferentes espécies, em óleo de fígado de tubarão, em sebos de algumas espécies.

O ácido nonadecanóico (C19) aparece na gordura do leite de diferentes espécies (Kurtz, 1980).

3.2 – Ácidos gordos insaturados

Quando na cadeia carbonada de um ácido gordo aparecem uma ou mais ligações duplas, este é designado ácido gordo insaturado.

A presença de ligações duplas leva à possibilidade de ocorrência de dois tipos de isomerismo: isomerias geométricas e de posição.

Os isómeros geométricos, estão relacionados com a composição relativa dos átomos de

hidrogénio ligados ao carbono da dupla ligação. Quando estes se encontram do mesmo lado da cadeia carbonada, trata-se de uma forma *cis*. A grande maioria dos ácidos gordos insaturados presentes na natureza encontra-se na forma *cis*. Quando os átomos de hidrogénio se encontram de lados contrários da cadeia carbonada ocorre uma forma *trans*.

As moléculas de ácidos gordos na forma *trans* apresentam-se menos dobradas em comparação às dos ácidos gordos na forma *cis*, o que se traduz num ponto de fusão mais elevado. Esta característica mantém-se mesmo que a dupla ligação esteja próxima de uma das extremidades da cadeia (Partidário, 1998).

3.2.1 – Ácidos gordos monoinsaturados

A posição da dupla ligação pode ser indicada por (n - x), onde, *n* é o comprimento da cadeia dos ácidos gordos e *x* é o número de carbonos da dupla ligação na região terminal da molécula (Christie, 1987).

O ácido decenóico (C10:1) é o que apresenta a mais baixa massa molecular em gorduras naturais. Este ácido aparece em todos os leites de ruminantes, sendo normalmente um ácido menor (Partidário, 1998).

O ácido dodecenóico (C12:1) tem dez isómeros possíveis, sendo o ácido lauroleico o mais comum, C12:1 (9), e que aparece na gordura de leite, nas formas *cis* e *trans* (Partidário, 1998).

O ácido tetradecenóico (C14:1) tem vários isómeros com ocorrência natural em gorduras animais particularmente em leite de ruminantes e óleos de peixe (Partidário, 1998).

O ácido pentadecenóico (C15:1) tem treze isómeros e apenas um aparece de forma natural, C15:1 (6) e aparece em óleo de baleia e em leite de ruminantes.

O ácido hexadecenóico (C16:1) tem como o isómero com maior distribuição o ácido palmitoleico, C16:1 (9). Este ácido pode aparecer também na sua forma *trans*. Em leites aparece em teores de 2 – 6%.

O ácido heptadecenóico (C17:1) apresenta vários isómeros, aparece naturalmente em leites. O que aparece em maior quantidade e o mais comum é o ácido margárico, C17:1 (9). Em leite de ruminantes, para além da ocorrência de outros isómeros *cis*, aparece pelo menos uma forma *trans*.

O ácido octadecenóico (C18:1) tem pelo menos cinco isómeros que podem ocorrer naturalmente. O mais comum e mais espalhado na natureza é o ácido oleico C18:1 (9). Em leite este é o ácido gordo insaturado mais importante em termos quantitativos, chegando a valores da ordem dos 20 – 25% do total de ácidos gordos constituintes. O ácido elaídico C18:1 (9 *trans*) aparece principalmente nas gorduras de ruminantes.

O ácido eicosenóico (C20:1) aparece nas gorduras naturais (Christie, 1987).

3.2.2 – Ácidos gordos polinsaturados

Os ácidos polinsaturados têm duas ou mais duplas ligações, as quais se encontram na forma *cis* na grande maioria das gorduras animais. Estes ácidos podem ter até seis insaturações apresentando pontos de fusão muito baixos.

O ácido linoleico, C18:2 (9,12) encontra-se largamente distribuído no reino vegetal, é também componente de gorduras animais, sobretudo de leite de diferentes espécies.

O ácido *cis* – 9, *trans* – 11 – octadecadienóico, vulgarmente conhecido por CLA ou ácido linoleico conjugado é reconhecido pelas suas propriedades anticarcinogénicas, e é um antioxidante de acção semelhante à vitamina E, que aparecendo naturalmente no leite deverá ser tido em consideração nos estudos sobre fenómenos oxidativos em produtos lácteos (Partidário, 1998).

3.2.3 – Ácidos gordos de cadeia ramificada

Os ácidos gordos de cadeia ramificada ocorrem naturalmente na natureza, mas tendem a estar presentes em pequenas proporções, excepto nas bactérias onde são componentes comuns (Christie, 1987).

A maioria destes ácidos apresentam uma ramificação simples, normalmente um grupo metilo, na penúltima posição contada a partir do grupo carboxilo ou na antepenúltima posição.

O ácido isobutírico (iC4) é o ácido gordo de mais baixa massa molecular que contém ramificações na cadeia carbonada. A sua ocorrência em produtos lácteos como por exemplo no queijo é resultante da actividade proteolítica bacteriana, particularmente do metabolismo da valina.

Os ácidos isovalérico (iC5) e isocapróico (iC6), estão presentes em produtos lácteos fermentados, como produto da desaminação oxidativa da leucina.

A partir do C9, os ácidos gordos ramificados aparecem como constituintes normais em sebos e em gordura de leite de ruminantes. Encontram-se normalmente presentes em valores inferiores a 1% (Partidário, 1998).

CAPÍTULO 4 – Queijos da Beira Baixa - DOP

4.1 – Queijo Amarelo da Beira Baixa – DOP

4.1.1 - Caracterização

O queijo Amarelo da Beira Baixa é definido no anexo II do Despacho nº 10518/2007 como sendo um queijo curado, de pasta semi-dura ou semi-mole, ligeiramente amarelada, com alguns olhos irregulares, obtido pelo esgotamento da coalhada após coagulação do leite de ovelha cru, estreme ou mistura de leite de ovelha e cabra, por acção de coalho animal e produzido na área geográfica delimitada de produção. Tem um teor de humidade de 54 a 69%, referido ao queijo isento de matéria gorda, e apresenta um teor de gordura de 45 a 60%, referido ao resíduo seco.

Exibe uma forma de cilindro baixo (prato), regular, com abaulamento lateral e ligeiro na face superior, sem bordos definidos. Crosta de consistência semi-dura, de aspecto bem formada, fina e inteira e de cor amarelo ou amarelo-torrado.

A sua pasta é de textura fechada, medianamente amanteigada de aspecto untuoso, com alguns olhos irregulares, de cor ligeiramente amarelada, uniforme. Quanto ao aroma e sabor apresenta um aroma intenso mas agradável e o sabor limpo e ligeiramente acidulado.

As dimensões e pesos estabelecidos variam para o diâmetro, entre os 12 e os 16 cm, para a altura de 3 a 5 cm. O peso varia entre 600 e 1000 g. A maturação tem um tempo mínimo de 40 dias e decorre em condições que variam entre os 10 e os 18°C para a temperatura, e entre os 50 e os 70% para a humidade relativa. Ao contrário de outras DOPs nacionais, não está referida na regulamentação qualquer indicação sobre medidas de maturação do queijo.

4.1.2 – Tecnologia de fabrico

A tecnologia de fabrico conduz a um produto que é antes de mais um alimento, com formas de apresentação diversificadas, representando uma enorme variabilidade de atributos que vão desde um produto de características muito pouco específicas, mas também muito homogéneo e reproduzível, sempre igual e apresentado sempre da mesma maneira, adequado a um consumo em massa e também à produção industrial, até um produto quase único, tornado de excelência, com uma tipicidade reconhecida mas dificilmente traduzível em definições, mesmo complexas, tornando-o objecto de procura por parte de apreciadores ou conhecedores (Martins e Vasconcelos, 2003/2004).

Na empresa onde a componente tecnológica do trabalho foi realizada o leite após o armazenamento é transferido para o permutador de placas, que o aquece à temperatura de 30°C. O queijo é fabricado com leite cru.

Findo este processo, o leite de ovelha e cabra, é transferido através de tubagens para a cuba de coagulação e é misturado nas mais diversas proporções.

Na coagulação usa-se coalho animal comercial, com composição média de 96% de quimosina e

4% de pepsina bovina, produto natural extraído de abomasos (quarto estômago) de vitelos lactentes. A quantidade utilizada é de 2g. 100 L⁻¹. O leite estará a uma temperatura de 30°C demorando esta operação no máximo 45 minutos (caderno de especificações). A coagulação é dada por terminada quando se obtém um corte vítreo.

Uma vez formada a coalhada procede-se ao seu corte que é feito utilizando liras horizontais e verticais, começando lentamente e aumentando gradualmente a velocidade até o grão ficar pequeno.

Distribui-se a coalhada de uma forma gradual através de uma enchedora automática pelas formas microperfuradas. Estas são direccionadas para a prensa horizontal onde os queijos são submetidos a prensagem durante mais ou menos 2 h 30 min, começando com uma pressão de 1,5 bar, aumentando gradualmente até chegar aos 6 bar.

Terminada a prensagem os queijos são desenformados utilizando uma desmoldadora, e mergulhados numa solução antibolor, efectuando-se seguidamente a salga dos queijos, sendo o método utilizado a salga a seco. Neste tipo de salga o sal é aplicado aos queijos imediatamente após fabrico, de forma empírica.

Segue-se a fase de cura em que as condições de ambiente a manter são de 10 a 18°C de temperatura e de 50 a 70% de humidade relativa. Serão efectuadas todas as operações necessárias ao óptimo estado de cura, nomeadamente viragens e lavagens de forma a manter a casca limpa e lisa. O período mínimo de cura para o queijo Amarelo da Beira Baixa DOP é de 40 dias (caderno de especificações).

Terminada a fase de cura ou maturação, os queijos são retirados da câmara, lavados e enviados para a expedição onde posteriormente são embalados e acondicionados para a venda. Neste tipo de queijo é colocado a marca de certificação da DOP sobre o rótulo.

As fases de fabrico deste tipo de queijo estão representadas na Figura 3.

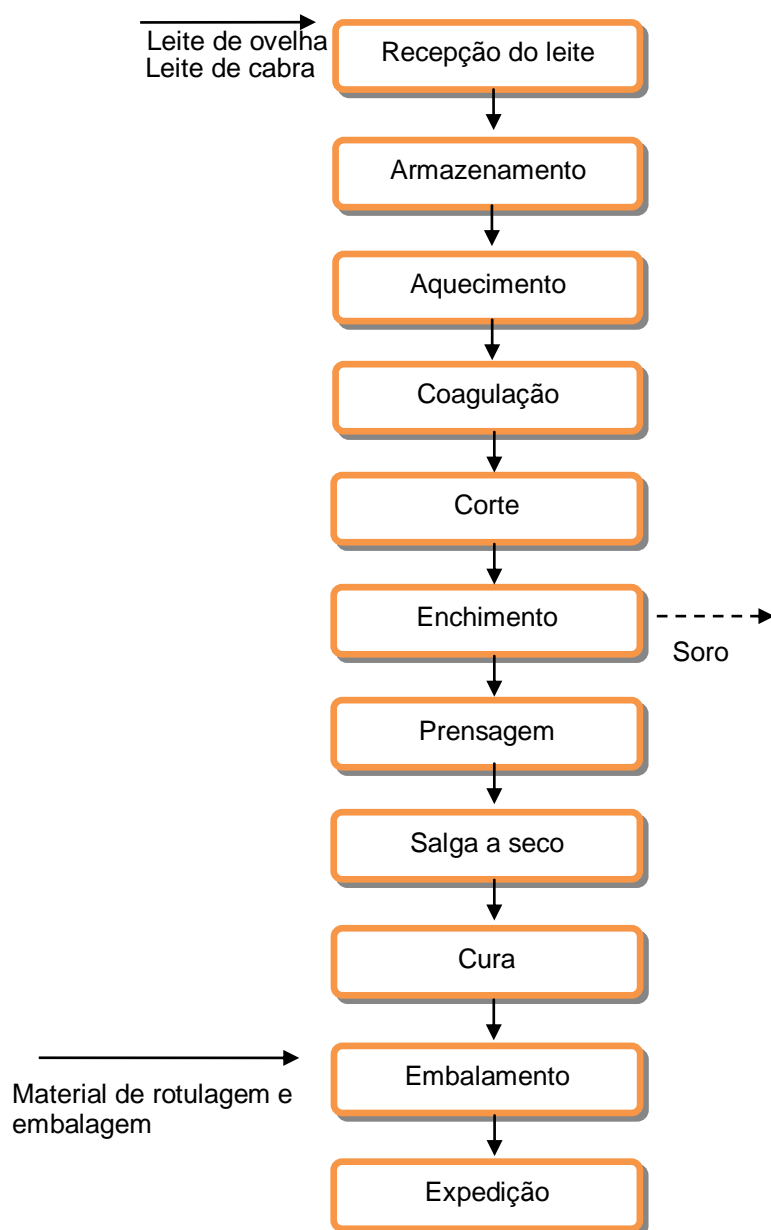


Figura 3 - Fases de produção do Queijo Amarelo da Beira Baixa – DOP.

4.2 – Queijo Picante da Beira Baixa – DOP

4.2.1 – Caracterização

O queijo Picante da Beira Baixa é definido no anexo III do Despacho nº 10518/2007 como sendo um queijo curado, de pasta dura ou semi-dura, cor ligeiramente acinzentada, textura muito fechada e quebradiça, sem crosta, obtido por esgotamento da coalhada após coagulação do leite de ovelha cru, estreme ou mistura de leite de ovelha e cabra, por acção do coalho animal e produzido na área geográfica delimitada de produção. Tem um teor de humidade de 45 a 63%, referido ao queijo isento de matéria gorda e com um teor de gordura de 35 a 60%, referido ao resíduo seco.

Apresenta uma forma de cilindro baixo (prato), com faces direitas, lisas e bordos definidos e é isento de crosta. A sua pasta é de textura fechada, sem olhos ou com pequenos olhos irregulares apresentando uma cor branca-suja a branca – acinzentada. O seu aroma é activo e característico, e o sabor forte e acentuadamente picante.

Quanto às dimensões é admitido um diâmetro entre 10 a 15 cm, uma altura de 3 a 5 cm e um peso de 400 a 1000 g.

A maturação tem um tempo mínimo de 120 a 150 dias, decorre em condições que variam entre 10 a 18°C para a temperatura e entre os 70 e os 80% para a humidade relativa. Ao contrário de outras DOPs nacionais, também neste caso não há qualquer referência regulamentar a medidas de maturação do queijo.

4.2.2 - Tecnologia de fabrico

O Queijo Picante da Beira Baixa tem uma forma de produção análoga à do Queijo Amarelo da Beira Baixa. Assim, a tecnologia de fabrico deste tipo de queijo utilizada na empresa onde foi efectuada parte do trabalho é exactamente a mesma que a utilizada no fabrico do Queijo Amarelo anteriormente descrita. Em fresco os dois queijos são rigorosamente similares, podendo, inclusive, proceder do mesmo lote de produção, sendo apenas pelo processo de cura que estes dois tipos de queijo se distinguem.

O aspecto mais interessante da cura é sem dúvida a forma empírica como o queijo é tratado. O queijo é virado e raspado constantemente, é adicionado sal em todas as faces do queijo consoante a necessidade, que é verificada devido à consistência do queijo.

Passado o tempo de cura os queijos são retirados da câmara, lavados e enviados para a expedição onde posteriormente são embalados, rotulados e acondicionados para a venda.

Este tipo de queijo tem também a particularidade de ser apresentado ao consumidor embrulhado numa folha de alumínio, devidamente rotulado e apresentado sobre o rótulo a marca de certificação da DOP. As fases de fabrico deste tipo de queijo estão representadas na Figura 4.

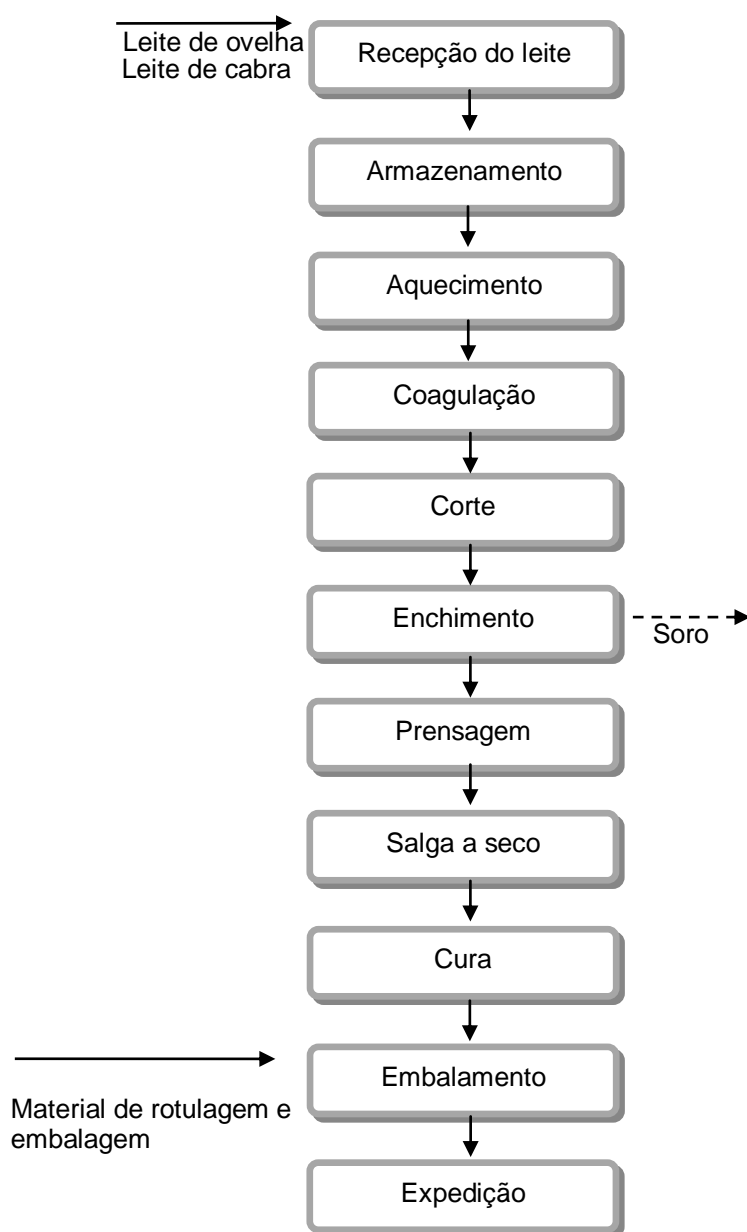


Figura 4 - Fases de produção do queijo Picante da Beira Baixa – DOP.

PARTE II- PARTE EXPERIMENTAL

CAPÍTULO 5 – METODOLOGIAS ANALÍTICAS

O trabalho experimental foi realizado em dois locais: (1) na queijaria DAMAR – onde foi fabricado o queijo e efectuado o acompanhamento da maturação do queijo e (2) na Unidade de Investigação e Tecnologias Alimentares do, L-INIA, INRB – onde foi efectuada a avaliação da evolução das propriedades físico-químicas do queijo, bem como a evolução dos ácidos gordos livres ao longo do processo de maturação, após optimização da técnica analítica, um dos objectivos principais deste trabalho.

5.1 - Amostras de queijos

O estudo da evolução das características de dois tipos de queijo fabricados na empresa foi efectuado a partir de um lote de queijo para cada tipo. Para cada tempo de amostragem foram recolhidos ao acaso dez queijos ($n=5$ Picante e $n=5$ Amarelo) após o fabrico. Cada amostra correspondeu a um quarto de queijo devidamente identificado, o que proporcionou um total de 30 amostras (15 Picante e 15 Amarelo).

A colheita de amostras nas diferentes fases de cura dos queijos está exemplificada na Figura 5

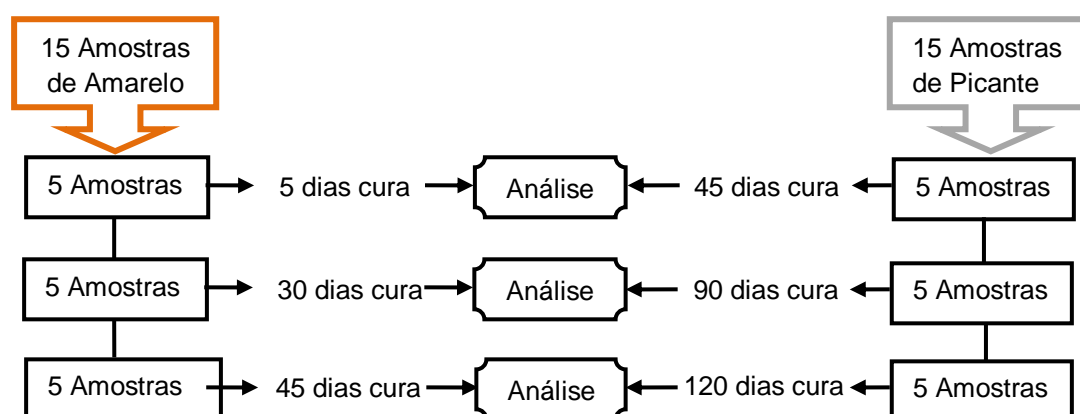


Figura 5 - Esquema elucidativo dos ensaios efectuados e recolha de amostras.

Foram, assim, recolhidas 30 amostras de queijo com diferentes dias de maturação, pertencendo ao mesmo lote de fabrico. Ambos os queijos foram obtidos pela coagulação do leite (30°C/45 min) a partir de coalho animal, moldagem, prensagem e desmoldagem automática e uma cura de até 45 dias (Amarelo) e de até 120 dias (Picante).

A codificação das amostras foi feita em função do tipo de queijo dos dias de maturação e do número representativo de cada quarto de queijo, conforme os códigos que constam nos Quadros III e IV.

Quadro III - Significado dos códigos atribuídos às amostras de Queijo Amarelo.

Código da Amostra	Número representativo	Tipo de queijo	Tempo de cura (dias)
1 A5	1	Amarelo	5
2 A5	2	Amarelo	5
3 A5	3	Amarelo	5
4 A5	4	Amarelo	5
5 A5	5	Amarelo	5
1 A30	1	Amarelo	30
2 A30	2	Amarelo	30
3 A30	3	Amarelo	30
4 A30	4	Amarelo	30
5 A30	5	Amarelo	30
1 A45	1	Amarelo	45
2 A45	2	Amarelo	45
3 A45	3	Amarelo	45
4 A45	4	Amarelo	45
5 A45	5	Amarelo	45

Quadro IV - Significado dos códigos atribuídos às amostras de Queijo Picante.

Código da Amostra	Número representativo	Tipo de queijo	Tempo de cura (dias)
1 P45	1	Picante	45
2 P45	2	Picante	45
3 P45	3	Picante	45
4 P45	4	Picante	45
5 P45	5	Picante	45
1 P90	1	Picante	90
2 P90	2	Picante	90
3 P90	3	Picante	90
4 P90	4	Picante	90
5 P90	5	Picante	90
1 P120	1	Picante	120
2 P120	2	Picante	120
3 P120	3	Picante	120
4 P120	4	Picante	120
5 P120	5	Picante	120

5.2 – Metodologias usadas na caracterização físico-química das amostras

De uma forma sumária, a caracterização das amostras de queijo foi efectuada relativamente a parâmetros de composição e a índices de maturação com base nas fracções azotadas, acidez, pH e acidez da gordura, utilizando os métodos seguintes.

Resíduo seco

Na determinação do resíduo seco usou-se o método gravimétrico (ISO 5534, 2004), sendo a diferença de massas da amostra determinada após secagem em estufa a 102°C, até obtenção de massa constante. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m).

Matéria gorda

O teor em gordura foi determinado segundo o método Van Gulik (NP 2105, 1983), que consiste na separação da fase gorda da amostra por centrifugação (1000-1200 rpm), num butirómetro Van Gulik, após dissolução das proteínas do queijo pelo ácido sulfúrico e com a separação da gordura facilitada pela adição de uma pequena quantidade de álcool isoamílico. Os resultados foram expressos em percentagem (m/m).

Proteína bruta

A amostra é digerida com uma mistura de ácido sulfúrico concentrado e sulfato de potássio. O sulfato de cobre (II) é utilizado como um catalisador para, assim, converter o nitrogénio orgânico presente para sulfato de amónio. O teor de azoto é calculado a partir da quantidade de amónia produzida e o teor de proteína bruta através do teor de nitrogénio obtido, com um factor de conversão de 6,38 (ISO 17837, 2008).

Cloretos

A amostra é suspensa em água. Esta suspensão é acidificada com ácido nítrico, e em seguida, os iões cloretos são titulados potenciométricamente com uma solução de nitrato de prata padronizada (ISO 5943, 2006).

pH

A determinação do pH foi efectuada por potenciometria à temperatura de 20°C na dispersão do queijo em água destilada, com uma diluição de 1:5. Para isso utilizou-se um potenciómetro, munido de um eléctrodo combinado de vidro (Afnor – Itsv, 1986).

Acidez

A acidez foi determinada por titulação com solução alcalina de hidróxido de sódio 0,1 N, após extracção dos componentes solúveis em água destilada a 40°C (AOAC – 1984). Os resultados foram expressos em g ácido láctico/100g queijo.

Acidez na gordura

A acidez na gordura foi determinada por titulação com solução padrão de hidróxido de tetrabutíamónio, usando uma solução de azul de timol como indicador (ISO 1740:2004). Os resultados foram expressos em mmol/100g gordura.

Fracções azotadas e coeficiente de maturação

As determinações do teor em azoto solúvel em água, azoto solúvel em ácido tricloroacético (TCA) a 12% e em ácido fosfotúngstico (PTA) a 5%, no queijo foram efectuadas segundo a adaptação da metodologia proposta por Kuchroo e Fox (1982). O azoto solúvel em água foi doseado sobre 5 g do extracto límpido pelo método de Kjeldahl, parcialmente automatizado com sistema Kjeltex I.

A um volume de extracto aquoso de queijo obtido para o azoto solúvel em água adicionou-se igual volume de TCA a 24% (m/v) e filtrou-se com papel de filtro Whatman nº40. O azoto do filtrado foi determinado pelo método de Kjeldahl parcialmente automatizado com sistema Kjeltex I.

Ao extracto aquoso do queijo (5 mL) adicionou-se ácido sulfúrico 3,95 M e (3,5 mL) de ácido fosfotúngstico a 33,3% (1,5 mL) e filtrou-se com papel de filtro Whatman nº542. O azoto do filtrado foi determinado pelo método de Kjeldahl parcialmente automatizado com sistema Kjeltex I.

5.3. – Determinação dos ácidos gordos livres

5.3.1 – Métodos de extracção e preparação das amostras para determinação dos AGL

Os métodos a seguir descritos foram os estudados para validar qual o melhor método a seguir, usando o queijo como amostra.

A determinação quantitativa dos ácidos gordos individuais envolve normalmente três fases: extracção da gordura, separação dos ácidos gordos livres dos triacilgliceróis e quantificação dos ácidos gordos livres.

Extracção da gordura e ácidos gordos livres, preparação das amostras de queijo (Método das resinas).

- Pesou-se 10 g de queijo para um almofariz, juntou-se 30 mL de ácido clorídrico (25%), 30 mL de etanol e homogeneizou-se.
- Colocou-se a mistura em ampola de decantação e procedeu-se a 3 extracções com mistura de 25 mL de éter etílico e 25 mL de éter petróleo.
- Retirou-se a fase etérea e evaporou-se em evaporador rotativo.

- A gordura assim extraída secou-se na estufa durante 30 min a cerca de 60°C.
- Pesou-se 250 mg de amostra de gordura para um balão de Erlenmeyer de 50 mL.
- Dissolveu-se a amostra em 30 mL da solução de acetona/metanol (2:1).
- Adicionou-se 500 mg de resina *Amberlyst A-21* e 1 mL da solução de padrão interno C7 (dissolvido em mistura acetona/metanol (2:1) numa concentração de 1:50).
- Colocou-se em agitação durante 1 hora com a ajuda de um agitador magnético.
- Decantou-se a mistura dos solventes arrastou-se os trigliceridos ou impurezas, deixando-se as resinas no fundo do Erlenmeyer.
- Lavou-se as resinas sob agitação, em 30 mL de diclorometano durante 30 minutos, arrastando-se os resíduos de trigliceridos
- Filtrou-se por papel de filtro e funil de Buchner, fazendo 3 lavagens com 5 mL de diclorometano (3x5).
- Secou-se a resina ao ar em hotte durante cerca de 1 hora.
- Transferiu-se as resinas já secas para um frasco de metilação.
- Adicionou-se às resinas 5 mL de solução trifluoreto de boro em metanol a 14%.
- Aqueceu-se em banho de água a 80°C durante 30 min.
- Retirou-se o frasco do banho e deixou-se arrefecer a temperatura ambiente.
- Juntaram-se 2 mL de solução de cloreto de sódio e 2 mL de isoctano, deixando separar as duas fases.
- Injectou-se 2 µL da fase superior orgânica no cromatógrafo (programa “FFA lácteos”).

Extracção da gordura e ácidos gordos livres, preparação das amostras de queijo (Método dos sais).

- Adicionou-se a 15 g de amostra de queijo moída, 20 mL de solução aquosa de ácido sulfúrico (10% p/v), em almofariz e procedeu-se à homogeneização da mistura.
- Em ampola de decantação adicionou-se 100 mL de mistura (1:1) de éter etílico e éter de petróleo, onde já se encontrava amostra homogeneizada, adicionou-se 1 mL da solução

padrão interno C7 (20 µL de C7 em 25 mL de éter etílico).

- Após se ter verificado a limpidez retirou-se para um balão de Erlenmeyer a fase superior com o auxílio de uma pipeta.
- Repetiu-se a extracção 3 vezes com 50 mL de mistura (1:1) de éter etílico e éter de petróleo.
- Adicionou-se algumas gotas de solução alcoólica de fenolftaleína às fases etéreas recolhidas e procedeu-se à neutralização com excesso de solução aquosa NaOH 0,1 M.
- Separou-se com água milli-Q em ampola de decantação os sais de ácidos gordos livres, fazendo 5 lavagens (10 mL) com 3 neutralizações com solução aquosa NaOH 0,1 M.
- Retirou-se a fase aquosa inferior para um balão de evaporação.
- Evaporou-se no evaporador rotativo e, depois de evaporada foi arrefecida e adicionou-se 3 mL de solução trifluoreto de boro em metanol a 14%.
- Transferiu-se esta mistura para um frasco de metilação, e aqueceu-se em banho de água a 80 °C durante 30 min.
- Retirou-se o frasco do banho e deixou-se arrefecer à temperatura ambiente.
- Juntou-se 3 mL de solução de cloreto de sódio mais 2 mL de isoctano.
- Agitou-se e injectou-se 2 µL da fase superior da mistura no cromatógrafo (programa “FFA lácteos”).

As taxas de recuperação obtidas para os diferentes ácidos gordos nos dois métodos de extracção ensaiados estão representadas no Quadro V.

Quadro V - Taxa de recuperação (%) dos métodos utilizados.

	% Recuperação (sais)	% Recuperação (resinas)
isoC4	134	16
C4	135	25
isoC5	146	26
C6	123	27
C7 pi	129	41
C8	120	27
C10	106	23
C12	99	19
C14	71	16
C16	65	16
C18	54	10

Como se pode observar o método dos sais apresenta valores de recuperação bastante superiores, tendo por isso sido este, o método utilizado para acompanhar a evolução de ácidos gordos livres no Queijo Amarelo e no Queijo Picante da Beira Baixa.

5.3.2 – Métodos de Determinação

A técnica mais utilizada para quantificar os níveis de ácidos gordos livres individuais no queijo é a cromatografia gasosa, técnica dominante para a análise de rotina dos ácidos gordos livres (Chairman, 1991).

A cromatografia gasosa é um método físico de separação onde há uma partição de compostos entre as duas fases, uma das quais estacionária e de grande área específica e a outra móvel, um fluido gasoso que circula através da primeira (Silva, 2006). A separação é devida às diferenças das constantes de partição de cada um dos componentes da amostra entre a fase líquida e a fase gasosa.

Esta técnica analítica envolve três fases: volatilização dos componentes da amostra num injector, separação dos componentes da mistura gasosa na coluna cromatográfica e detecção de cada um dos componentes à medida que chega ao detector (Grob, 1985).

As condições de análise no cromatógrafo utilizado (GC Trace 2000 da Thermo Quest) foram as seguintes:

- pressão do gás vector (hélio) - de 70 kPa,
- temperatura de análise - de 70°C (3 min) com rampa de 5°C/min até 195°C (60 min),
- coluna – DB23 com 60 m×0,25 mm×0,25 µm,
- temperatura do injecto - 220°C,
- temperatura do detector - FID a 280°C,
- split 1/48.

Com estas condições de análise criou-se um programa no cromatógrafo designado por “FFA lácteos”.

5.3.3 – Validação do método de extracção dos ácidos gordos livres

Para o cálculo das percentagens de recuperação utilizaram-se duas misturas de padrões de ácidos gordos livres em duas soluções (solução A e solução B). A solução A continha os ácidos C4 (96 mg), isoC4 (53,44 mg), isoC5 (51,80 mg), C6 (231,5 mg), C7 (4,59 mg), C8 (91 mg), C10 (100 mg), C12 (100 mg), C14 (100 mg), C16 (100 mg) e C18 (100 mg), dissolvidos em 20 mL de mistura acetona/metanol (2:1). Esta solução foi usada no método das resinas. A solução B continha os mesmos ácidos gordos, mas estes estavam dissolvidos em 20 mL de mistura (1:1) de éter etílico e éter de petróleo. Esta solução foi usada no método dos sais.

Para obter uma maior exactidão dos resultados utilizou-se uma solução de padrão interno que continha C7 (20 µL), dissolvido em 25 mL de éter etílico.

A determinação dos ácidos gordos livres (AGL) foi organizada em duas partes. A primeira consistiu na validação do método analítico, e a segunda centrou-se na monitorização da evolução dos teores destes constituintes ao longo da maturação. Para a primeira parte a amostra utilizada foi banha comercial (n=5) de marca branca e padrões de ácidos gordos livres. Para a segunda recolheram-se as amostras na empresa DAMAR – produtora de queijos, LDA. (Concelho de Fundão).

Diferentes métodos têm sido propostos para a determinação de ácidos gordos livres presentes nos produtos lácteos. As características dos ácidos gordos livres, como por exemplo os diferentes comprimentos de cadeia carbonada associada a diferentes volatilidades dificultam a escolha de um método único (Partidário, 1998). Um dos objectivos deste trabalho como se referiu foi determinar qual o melhor método para a extracção dos ácidos gordos livres, sendo estudados dois métodos, o “método das resinas” e o “método dos sais”.

Para a validação do método usou-se banha comercial adicionada de quantidades conhecidas de padrões de ácidos gordos livres, sendo assim o passo de extracção de gordura não foi efectuado, passando-se directamente para a extracção e quantificação dos ácidos gordos livres.

Para a quantificação dos ácidos gordos livres das amostras procedeu-se ao cálculo das áreas

relativas, ou seja, a relação entre as áreas obtidas para os diferentes picos e a área obtida para o padrão interno (C7), sendo ainda eliminados todos os picos correspondentes a contaminações que aparecem nos cromatogramas.

A massa de ácidos gordos livres (AGL) expressa em mg por kg de amostra foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

$$mg\ AGL / kg\ amostra = \frac{Área\ relativa \times 1000 \times 0,734}{m\ amostra}$$

O factor 0,734 corresponde à massa de C7 que foi introduzida, por cada mL adicionado de solução de padrão interno (20 µL de C7, com a densidade de 0,918 g/mL; em 25 mL de éter).

Fizeram-se cinco repetições de metilação directa de 1 mL de cada uma das soluções padrão (A e B) seguidas de injeção no cromatógrafo. Com as áreas obtidas através da metilação directa e as obtidas após proceder aos dois processos de extracção, calcularam-se as percentagens de recuperação, que constam no Quadro V atrás apresentado. Com base nestes valores foi seleccionado o método de extracção a utilizar para as amostras de queijo.

No referente à análise cromatográfica, dado que a análise de ácidos gordos por cromatografia gasosa é uma técnica acreditada e usada em rotina no laboratório, permitiu que se omitissem as fases de optimização do método cromatográfico.

CAPÍTULO 6 - Resultados e discussão

As determinações efectuadas nos dois tipos de queijo visaram principalmente identificar a evolução das suas características ao longo da cura, quer sob o ponto de vista da composição quer sob o ponto de vista da maturação. Antes da análise de resultados é importante referir o significado e utilidade de alguns parâmetros.

Em geral os teores dos principais constituintes são semelhantes para muitos dos diferentes tipos de queijo, dependendo fortemente do leite utilizado e da tecnologia de fabrico (Lawrence, 1988). Não dão assim quaisquer indicações acerca da qualidade do produto, mas alguns deles são no entanto, utilizados para a classificação e definição do mesmo. É o caso por exemplo, dos teores de humidade, gordura e respectiva relação com o resíduo seco (Vasconcelos, 1990).

À semelhança do que se passa internacionalmente, o queijo em Portugal é classificado quanto à cura e seus agentes específicos, quanto à consistência em função do teor de humidade referido ao produto isento de matéria gorda, e quanto ao teor de gordura referido ao resíduo seco (Vasconcelos, 1990). Estes são critérios de classificação genéricos, que não esgotam o tema da classificação do queijo, podendo esta, para maior informação ser complementada por aspectos tecnológicos relevantes que forneçam indicações adicionais com utilidade para as diferentes situações, como seja, por exemplo o tipo de coagulação.

O pH e a acidez são parâmetros importantes pois condicionam o crescimento e a actuação da flora microbiana, tendo assim um papel relevante em todo o processo de evolução do queijo (Vasconcelos, 1990). O pH e a acidez conjuntamente com alguns parâmetros baseados na proporção de algumas fracções azotadas, como o coeficiente de maturação, ou com níveis de acidez da gordura ou de alguns ácidos gordos livres, constituem alguns dos chamados índices de maturação. O efeito conjunto de todos os factores é muito complexo, condicionando as características finais do produto.

Depois de uma breve referência a aspectos gerais ligados à composição, apresentam-se de seguida os resultados obtidos para o Queijo Amarelo e Queijo Picante.

6.1. – Monitorização da evolução do Queijo Amarelo da Beira Baixa DOP

Os resultados obtidos na determinação da composição média do Queijo Amarelo, encontram-se no Quadro VI.

Quadro VI - Composição média do Queijo Amarelo.

		RS (g/100g)	MG (g/100g)	Humidade (g/100gQIMG)	MG (g/100gRS)	PB (g/100g)	PB (g/100gRS)	Cloretos (gNaCl/100g)	Cloretos (gNaCl/100gRS)
5 dias de cura	Média	50,53	30,10	70,80	59,60	18,78	37,17	1,64	3,26
	DesvPad	1,22	1,47	2,44	3,41	0,62	1,15	0,18	0,38
30 dias de cura	Média	54,32	29,30	64,61	53,94	20,10	37,01	2,25	4,15
	DesvPad	0,82	0,76	0,83	1,00	0,88	1,53	0,35	0,64
45 dias de cura	Média	56,48	30,10	62,27	53,32	20,32	35,98	2,47	4,37
	DesvPad	0,93	0,42	1,65	1,52	0,49	0,71	0,35	0,58

Como já foi referido anteriormente, o Despacho nº 10518/2007 estipula quais as características a que o Queijo Amarelo da Beira Baixa deve obedecer. Este Despacho indica que o teor de humidade de queijo isento de matéria gorda possa variar de 54 a 69%, para uma pasta que deve ser medianamente amanteigada, e que o teor de gordura referido ao resíduo seco possa variar de 45 a 60%.

Assim da observação do Quadro VI, verifica-se que os valores médios obtidos para estes parâmetros se situam dentro do previsto. Segundo a norma NP-1598 (1983), corresponde a um queijo de pasta semi-mole e quanto ao teor em matéria gorda é classificado como queijo gordo. A pasta, no entanto, não se apresentou amanteigada no final do tempo mínimo de cura (dados não apresentados).

Passando agora a uma análise mais pormenorizada, em relação à humidade, antes de mais, verificou-se que os resultados obtidos se assemelham aos obtidos por outros autores (Martins e Carreiro, 1996; Carneiro, 1999; Freitas *et al.*, 2000). Podemos ainda observar que a humidade diminui ao longo do tempo encontrando-se a maior diferença na primeira fase de cura (5-30 dias de cura), de 70,80% para 64,61%, com o resíduo seco a aumentar para o final da cura (Figura 6) fruto da concentração dos sólidos por redução do teor em humidade.

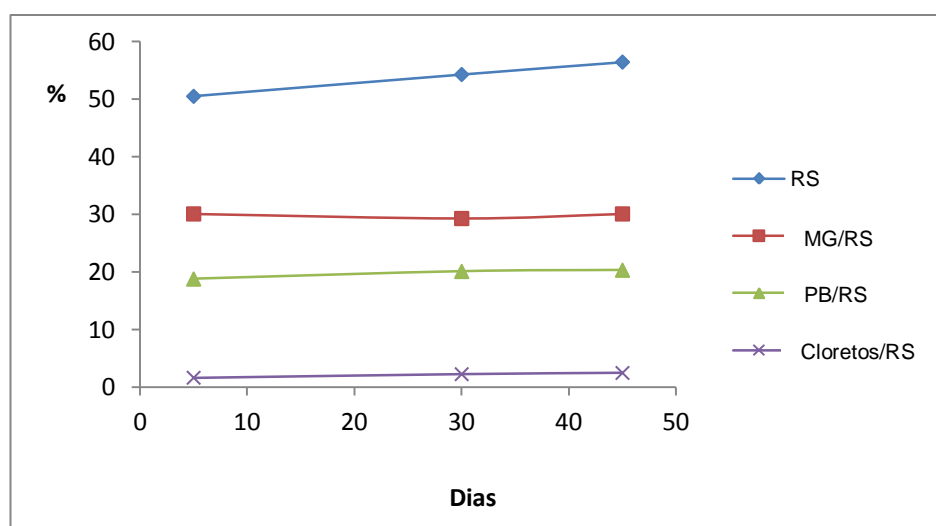


Figura 6 - Evolução da composição média do Queijo Amarelo.

Quanto ao teor em matéria gorda não se manifestaram grandes diferenças, o que não era o previsto, visto que devido à perda de água a gordura devia aumentar, tal como encontrado por outros autores (Carneiro, 1999; Alvarenga, 2008).

Para o teor de cloretos na matéria seca, observa-se um aumento ao longo da maturação, com os valores finais a estarem de acordo com os referidos por Freitas *et al.*, (2000). O teor médio em proteína bruta como se pode observar revela uma ligeira diminuição ao longo da maturação este valor encontra-se abaixo do obtido por Freitas *et al.*, (2000).

O Quadro VII resume os resultados médios obtidos para os índices de maturação.

Quadro VII - Resultados médios obtidos para os índices de maturação do Queijo Amarelo.

		pH	Acidez(g Ác.Láctico /100g)	Acidez na MG(mmol/ 100 g gordura)	Az. total (g/100g)	Az. sol. Água (g/100g)	CM	Az. sol. TCA 12% (g/100g)	Az. sol.TCA 12%(g/10 0gNt)	Az. sol. PTA 5% (g/100g)	Az. sol. PTA 5% (g/100g Nt)
5 dias de cura	Média	5,34	0,92	4,10	2,94	0,26	8,80	0,12	4,07	0,04	1,40
	DesvPad	0,52	0,11	0,22	0,10	0,01	0,36	0,07	2,38	0,02	0,74
30 dias de cura	Média	5,24	2,02	5,01	3,15	0,56	17,69	0,28	8,77	0,06	1,97
	DesvPad	0,45	0,46	0,23	0,14	0,02	1,36	0,03	0,91	0,01	0,38
45 dias de cura	Média	5,81	0,93	6,32	3,18	0,73	22,86	0,33	10,49	0,07	2,32
	DesvPad	0,23	0,07	1,44	0,08	0,02	0,59	0,04	1,39	0,01	0,28

Os resultados obtidos para o pH estão de acordo com os obtidos noutros estudos sobre o Queijo Amarelo da Beira Baixa (Freitas *et al.*, 2000), com a evolução que se pode observar na Figura 7. A acidez aumentou do 5º dia de cura para o 30º dia, seguida de um ligeiro decréscimo até ao final da cura. A subida da acidez foi muito evidente, o que se pode explicar pelo desenvolvimento de bactérias acidificantes nesta fase e pela conversão da lactose residual em ácido láctico (Lawrence *et al.*, 1987). No final da cura observou-se um decréscimo da acidez, que pode ser atribuída à utilização do ácido láctico com formação de produtos neutros ou alcalinos (McSweeney e Fox, 1993; Watkinson *et al.*, 2001).

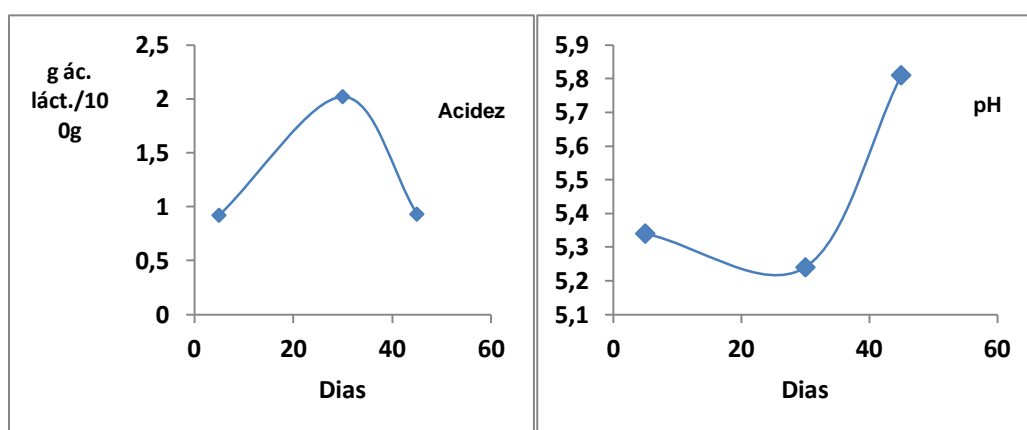


Figura 7 - Evolução do pH e da Acidez ao longo da maturação do Queijo Amarelo.

Como era de esperar os valores de pH evoluíram de forma oposta. O decréscimo inicial dos valores de pH, como já foi referido anteriormente, deve-se à fermentação da lactose do queijo, com formação de ácido láctico e pode ser importante para prevenir o crescimento de bactérias patogénicas ou indesejáveis.

O coeficiente de maturação (CM) regista um aumento acentuado nos primeiros dias de cura nomeadamente nos primeiros 30 dias (Figura 8). Logo no início deste período de tempo assiste-se à primeira manifestação da proteólise com o aparecimento da fracção solúvel (Jovita, 1991). Segundo o decreto nº 22/88 não existe um valor mínimo regulamentar para o coeficiente de maturação deste tipo de queijo, a única DOP de Queijo da Beira Baixa em que o valor mínimo de maturação está estipulado é o Queijo de Castelo Branco, cujo coeficiente de maturação mínimo deverá ser 38. O resultado obtido é bem inferior a esta norma e ao obtido em outros estudos já efectuados em Queijo de Castelo Branco (Carneiro, 1999), denotando em comparação fraca intervenção dos fenómenos de proteólise.

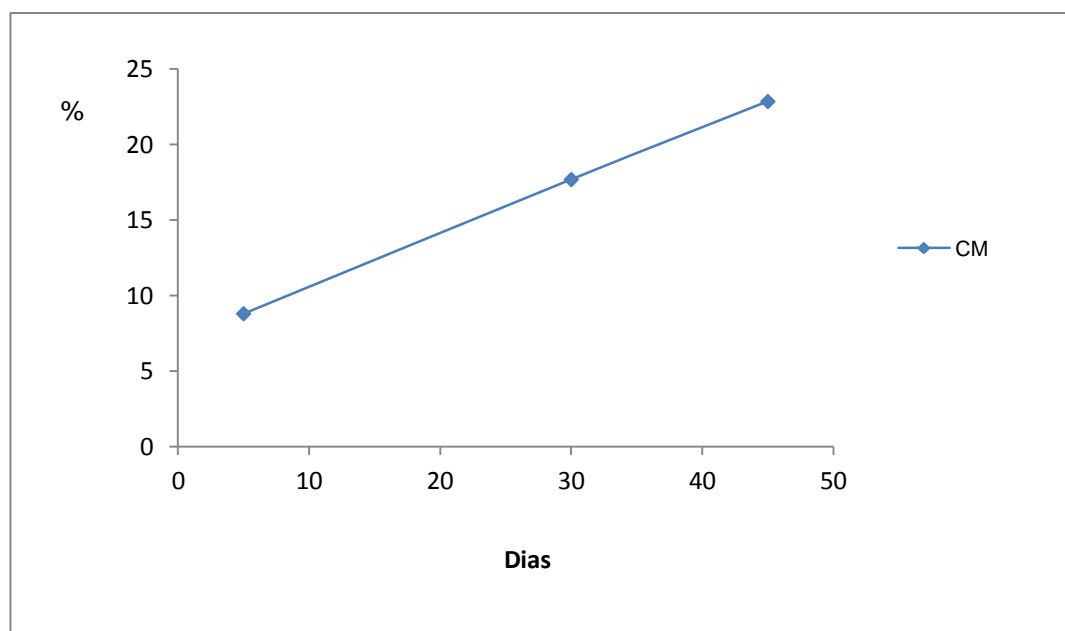


Figura 8 - Evolução do coeficiente de maturação (CM), no Queijo Amarelo.

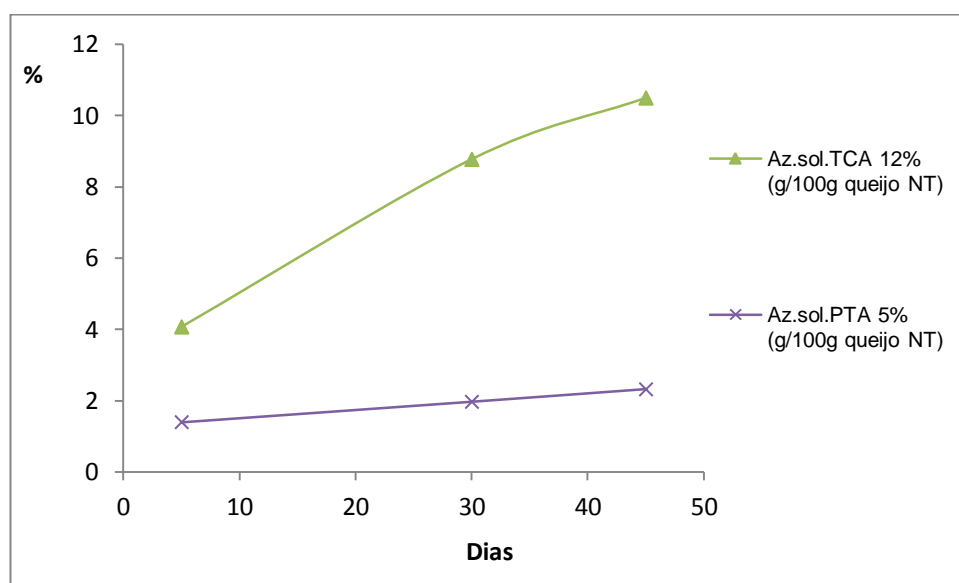


Figura 9 - Evolução dos índices de maturação médios no Queijo Amarelo.

Quanto às fracções azotadas como se pode observar na Figura 9 verificou-se globalmente uma evolução pouco acentuada, sendo estes resultados muito inferiores em comparação com resultados referidos por outros autores (Carneiro, 1999; Freitas *et al.*, 2000).

O azoto solúvel em TCA 12% e o azoto solúvel em PTA 5% representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto estão as proteínas e péptidos a ser degradados, sendo provável que as amostras estivessem pouco hidrolisadas. Como já foi referido existem

diferenças em comparação com outros autores, as quais podem ser explicadas pelo facto de como refere Tavarina *et al.*, (2006) as dinâmicas de maturação dos queijos de ovelha, obtidos a partir de leite cru, dependerem da qualidade do leite, nomeadamente da qualidade e quantidade de microrganismos e enzimas nativas. Tanto o Queijo de Castelo Branco DOP como o Queijo Amarelo DOP são fabricados com leite cru e podemos estar em presença de uma fraca actividade microbiana no queijo analisado, fruto quer da qualidade do leite quer das condições de fabrico específicas. Os resultados obtidos não são, de facto bons indicadores quanto à evolução do queijo ao longo da maturação, o que se pode traduzir em falta de características quer de textura quer de aroma e sabor, ou corresponderem apenas a um tipo de queijo com características substancialmente diferentes das do Queijo de Castelo Branco. Não devemos aqui esquecer que o leite utilizado no fabrico é neste caso uma mistura de leites de ovelha e de cabra.

Os resultados obtidos para a determinação dos ácidos gordos livres voláteis do Queijo Amarelo ao longo da maturação, encontram - se no Quadro VIII. Para melhor se visualizar a evolução ao longo do tempo dos diferentes ácidos apresentam-se os resultados na Figura 10.

Quadro VIII - Valores dos ácidos gordos livres voláteis em mg AGL/kg amostra.

	A5	A30	A45
C2	n.d	37,36	43,53
C3	n.d	1,82	10,05
isoC4	0,85	35,44	37,25
C4	20,45	60,77	99,63
isoC5	2,26	73,62	94,67
C5	n.d	n.d	0,95
C6	25,87	62,26	101,09
C8	33,28	66,51	86,14
C9	0,82	1,57	1,92
C10	92,03	173,33	212,16

n.d - não detectado

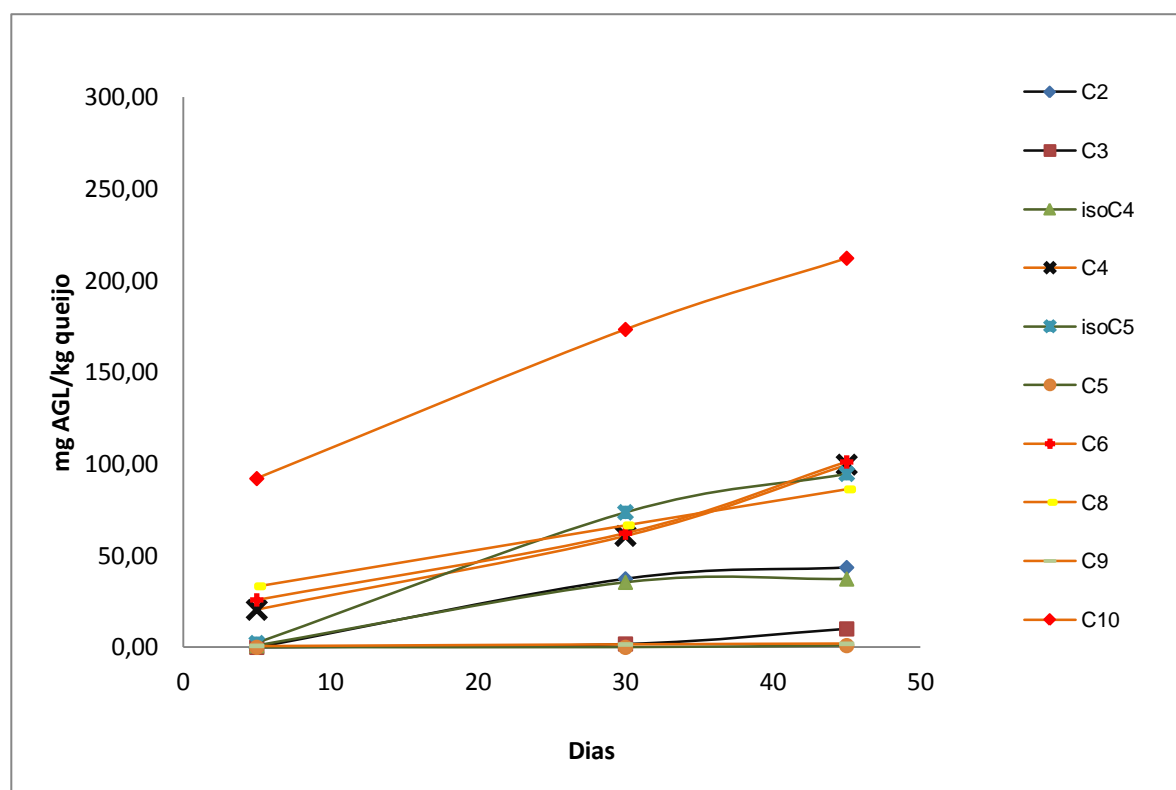


Figura 10 - Evolução dos ácidos gordos voláteis (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.

Como se pode observar os ácidos gordos livres que provêm da lipólise, assinalados com a cor laranja, aumentam ao longo do tempo com maior evidência para o C10.

Os ácidos gordos livres voláteis provenientes da proteólise estão assinalados a verde. E estes estão presentes logo no 5º dia de maturação significando que já existem aminoácidos livres nos primeiros dias de maturação, o que permite, pela respectiva transformação por via microbiana a formação destes ácidos. Estes valores estão de acordo com o referido por outros autores (Partidário *et al.*, 1998).

Os que estão assinalados a preto são os ácidos gordos livres voláteis resultantes de metabolização do lactato. Estes só têm valores com significado aos 30 dias o que pode expressar uma fraca actividade microbiana na metabolização do lactato.

No geral os ácidos gordos livres voláteis aumentam ao longo da cura, salientando que os que provêm da lipólise estão presentes desde o 5º dia, o que vem ao encontro das conclusões de outros autores (Freitas e Malcata, 1997).

Os resultados obtidos para a determinação dos ácidos gordos livres saturados do Queijo Amarelo ao longo da maturação, encontram-se no Quadro IX e a sua evolução está graficamente representada na Figura 11.

Quadro IX - Valores dos ácidos gordos livres saturados em mg AGL/kg amostra.

	A5	A30	A45
C11	0,76	1,61	2,09
C12	31,99	65,89	76,57
isoC13	0,83	1,59	2,26
C13	0,46	0,99	1,18
isoC14	0,49	1,06	1,10
C14	45,12	116,15	115,92
isoC15	1,33	5,22	n.d
aisoC15	1,88	4,91	4,39
C15	4,01	10,90	9,82
isoC16	n.d	0,74	n.d
C16	87,95	263,30	219,50
isoC17	1,39	1,66	2,26
aisoC17	n.d	4,25	3,74
C17	2,17	7,12	5,50
C18	38,35	135,68	96,58
C20	0,43	3,83	2,85
C21	n.d	1,25	1,09

n.d - não detectado

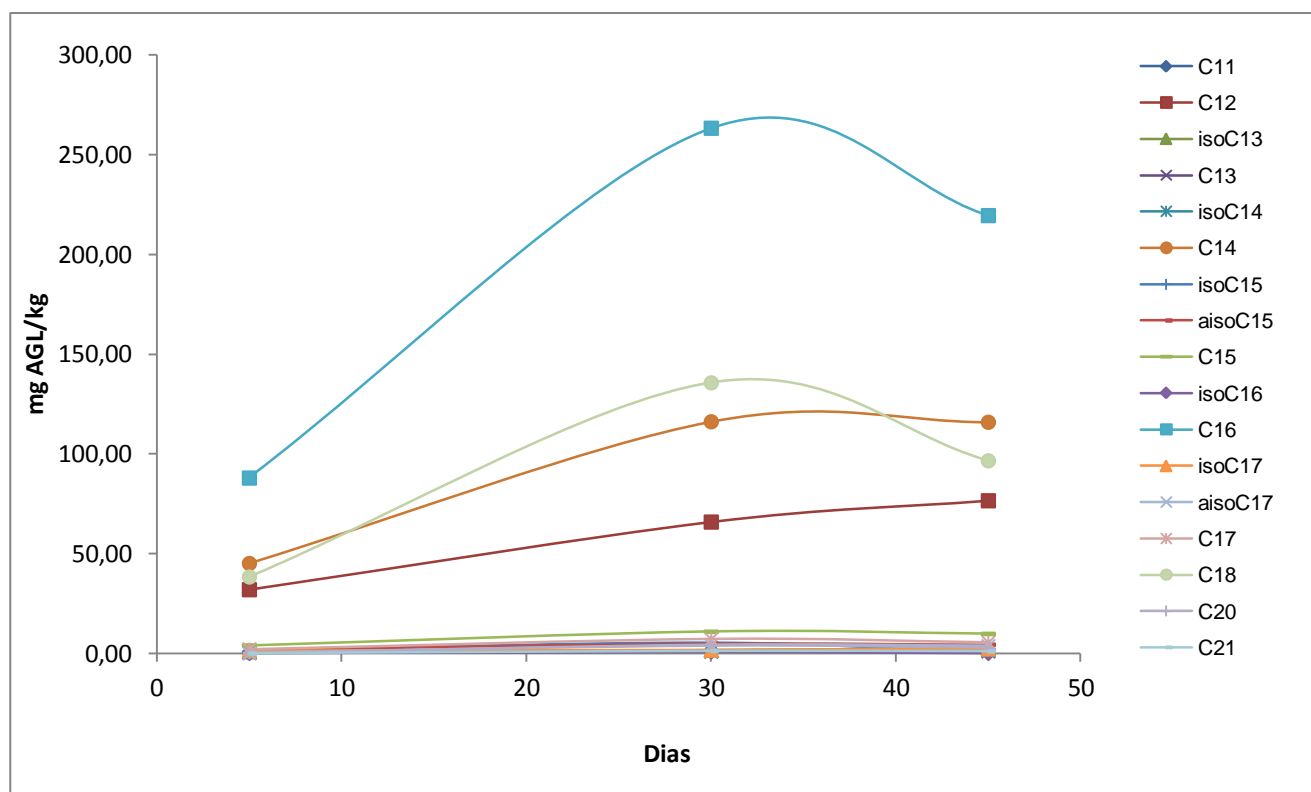


Figura 11 - Evolução dos ácidos gordos saturados (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.

Ao observar o gráfico da Figura 11, nota-se que os constituintes minoritários de nº ímpar de átomos de carbono não apresentam valores significantes. Outros autores nem fazem referência a estes ácidos gordos livres saturados (Macedo e Malcata, 1996; Freitas e Malcata, 1996).

Olhando para os constituintes majoritários de nº par de átomos de carbono, verifica-se que aumentam a sua proporção para o dobro ou mais que o dobro para os 30 dias. A partir dos 30 dias estabilizam ou diminuem.

Para os que estão presentes em maior quantidade (C16, C18, C14 e C12), os valores estão de acordo com outros autores (Nájera *et al.*, 1993).

Os resultados obtidos para os ácidos gordos livres insaturados do Queijo Amarelo durante a maturação, encontram-se no Quadro X. Para melhor se visualizar a evolução ao longo do tempo dos diferentes ácidos apresentam-se os resultados na Figura 12.

Quadro X - Valores dos ácidos gordos livres insaturados em mg AGL/kg amostra.

	A5	A30	A45
C10:1	12,65	19,60	17,16
C12:1	0,45	1,61	0,62
C14:1	1,16	n.d	5,46
C15:1	0,81	2,41	2,12
C16:1t	1,22	2,19	2,91
C16:1(7)	1,45	4,15	5,13
C16:1(9)	2,93	7,37	8,31
C16:1(11)	1,49	3,78	3,58
C17:1	1,00	2,98	1,62
C18:1t9	11,62	38,56	29,34
C18:1(9)	71,37	248,62	206,64
C18:1(11)	0,24	1,56	2,51
C18:2(t,t,)	0,69	5,94	2,82
C18:2(c,t)	1,35	6,18	4,11
C18:2(t,c)	1,75	2,47	2,82
C18:2	9,28	32,84	31,30
gama-C18:3	n.d	1,53	1,85
alfa-C18:3	3,26	10,30	10,56
C18:2(c9,t11)	n.d	2,42	1,34
C20:1(9)	0,66	5,08	5,93
C20:1(11)	n.d	0,65	1,10
C20:2	0,69	5,60	2,81
C20:3	1,38	3,54	4,53

n.d - não detectado

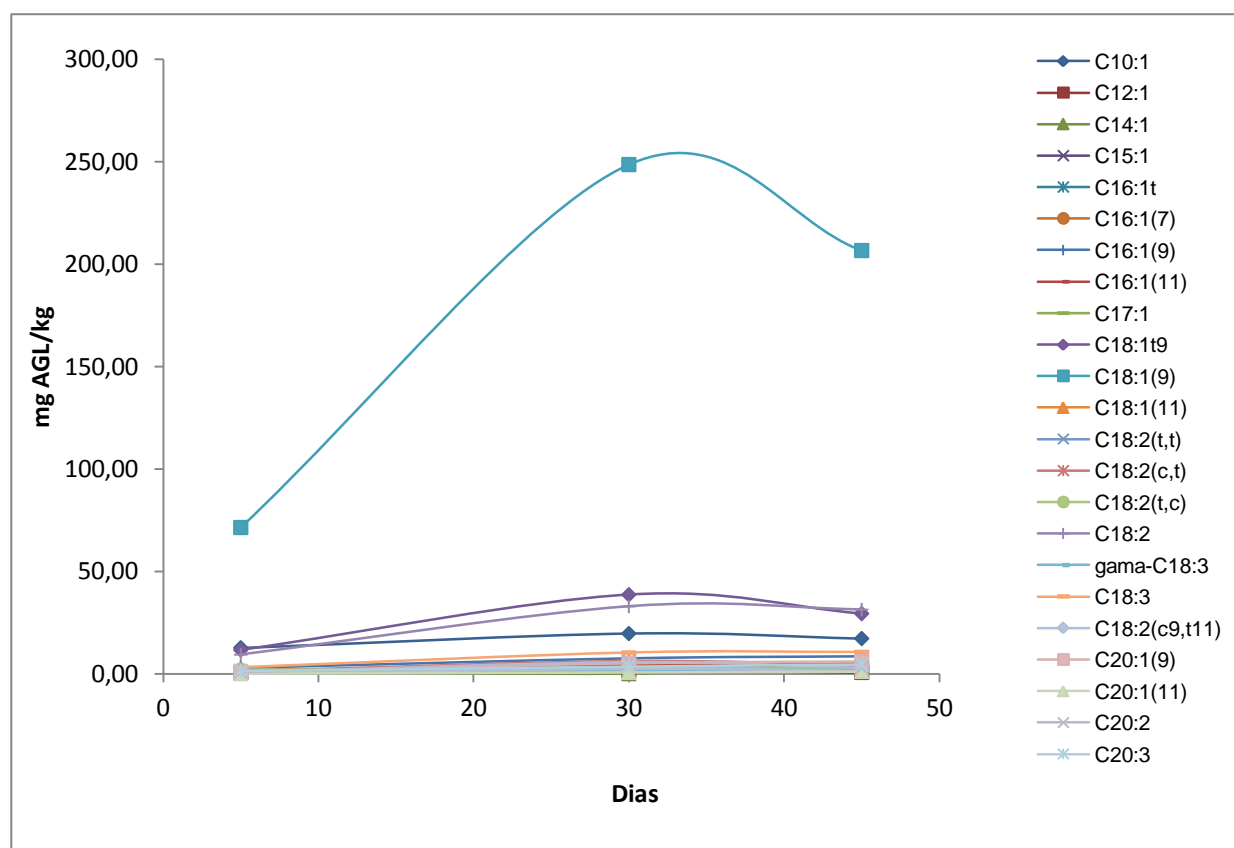


Figura 12 - Evolução dos ácidos gordos insaturados (mg AGL/kg) no Queijo Amarelo ao longo da maturação.

Os ácidos gordos livres insaturados apresentam o mesmo comportamento que os ácidos gordos livres saturados, não alterando ou diminuindo a sua proporção a partir do 30º dia.

O ácido oleico (C18:1) é o que está presente em maior quantidade, e estes valores vão ao encontro de valores obtidos por outros autores (Macedo e Malcata, 1996).

De uma forma geral olhando os gráficos, observa-se que os ácidos gordos livres voláteis que correspondem aos ácidos gordos de cadeia curta, aumentam durante o tempo de maturação. Já os ácidos gordos livres saturados e insaturados correspondentes aos ácidos gordos de cadeia média e longa de átomos de carbono, a partir dos 30 dias estabilizam ou diminuem. Estes resultados são consistentes com o facto das lipases (provenientes principalmente do leite e microrganismos) envolvidas na maturação do queijo, hidrolisarem preferencialmente ácidos gordos de cadeia curta uma vez que estes ácidos predominam na posição sn-3 no triglicérido (Macedo e Malcata, 1996).

6.2. – Monitorização da evolução do Queijo Picante da Beira Baixa DOP

Os resultados obtidos na determinação da composição média do Queijo Picante, encontram-se no Quadro XI.

Quadro XI - Composição média do Queijo Picante.

		RS (g/100g)	MG (g/100g)	Humidade (g/100gQI MG)	MG (g/100g RS)	PB (g/100g)	PB (g/100g RS)	Cloretos (gNaCl/100g)	Cloretos (gNaCl/100gRS)
45 dias de cura	Média	59,95	26,30	54,36	43,95	20,86	34,81	6,09	10,17
	DesvPad	2,45	0,76	3,61	2,60	0,66	0,58	0,33	0,51
90 dias de cura	Média	62,76	30,10	53,27	47,98	20,28	32,32	8,29	13,24
	DesvPad	2,07	1,08	2,77	1,83	0,43	0,47	0,88	1,75
120 dias de cura	Média	60,94	30,70	56,33	50,35	21,78	35,71	8,04	13,23
	DesvPad	2,17	1,72	1,87	1,23	2,33	3,13	0,62	1,40

O Despacho nº 10518/2007, estipula quais as características a que o Queijo Picante da Beira Baixa deve obedecer. Este Despacho indica que o teor de humidade de queijo isento de matéria gorda possa variar de 45 a 63%, para uma pasta que deve ser fechada, e o teor de gordura referido ao resíduo seco possa variar de 35 a 60%.

Assim, da observação do Quadro XI, verifica-se que os valores médios obtidos para estes parâmetros se situam dentro do previsto. Segundo a norma NP-1598 (1983), corresponde a um queijo de pasta semi-dura e quanto ao teor em matéria gorda é classificado como queijo gordo.

Passando a uma análise parâmetro a parâmetro, em relação à humidade, verificou-se que os resultados obtidos não se assemelham aos obtidos por outros autores (Freitas *et al.*, 2000). Diminuindo do 45º dia até ao 90º dia o que era de se esperar, havendo de seguida um aumento até ao 120º dia, provavelmente devido à lavagem periódica com água canalizada ao longo do processo de maturação (Freitas e Malcata, 1998). As variações do resíduo seco em comparação com o Queijo Amarelo podem atribuídas à superfície, especialmente porque o Queijo Picante não apresenta uma casca real, bem como a difusão do sal para o interior do queijo ao longo da maturação (Freitas *et al.*, 1997).

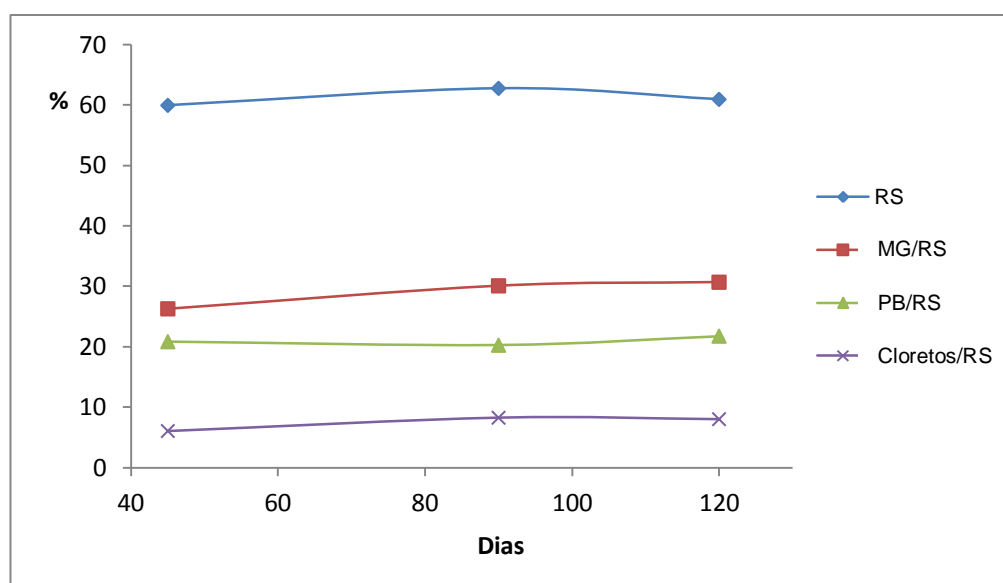


Figura 13 - Evolução da composição média no Queijo Picante.

Quanto à matéria gorda em qualquer dos modos de expressão há um ligeiro aumento ao longo da maturação. Relativamente à composição o facto mais notório é o teor em cloretos expressos em cloreto de sódio deste queijo, observando-se um aumento durante a maturação, com os valores finais de acordo com os referidos por Freitas e Malcata (1996). Este tipo de queijo apresenta valores mais elevados que o Queijo Amarelo, o que é de se esperar pois como já foi referido na tecnologia de fabrico do Queijo Picante é adicionado sal durante todo o tempo de cura. O teor médio em proteína bruta encontra-se abaixo do referido por Freitas e Malcata (1996).

O Quadro XII resume os resultados médios obtidos para os índices de maturação.

Quadro XII - Resultados médios obtidos para os índices de maturação do Queijo Picante.

		pH	Acidez (g Ác. Lático/100g)	Acidez na MG (mmol/100 g gordura)	Az. total (g/100g)	Az. sol. Água (g/100g)	CM	Az. sol. TCA 12% (g/100g)	Az. sol. TCA 12% (g/100gNt)	Az. sol. PTA 5% (g/100g)	Az. sol. PTA 5% (g/100gNt)
45 dias de cura	Média	5,64	0,75	5,79	3,27	0,33	10,09	0,16	4,93	0,10	3,05
	DesvPad	0,12	0,11	0,41	0,10	0,06	1,90	0,05	1,72	0,02	0,81
90 dias de cura	Média	5,96	0,69	7,73	3,18	0,43	13,53	0,18	5,82	0,07	2,33
	DesvPad	0,07	0,11	0,99	0,07	0,13	4,21	0,06	1,84	0,01	0,31
120 dias de cura	Média	6,45	0,47	8,86	3,41	0,34	10,22	0,20	5,95	0,06	1,92
	DesvPad	0,17	0,09	1,68	0,36	0,11	4,05	0,02	1,08	0,01	0,52

Os resultados obtidos para o pH estão de acordo com os obtidos noutros estudos sobre o Queijo Picante da Beira Baixa (Freitas e Malcata, 1996), com a evolução que se pode observar na Figura 14. A acidez diminui ligeiramente do 45º dia de cura para o 90º dia, seguida de uma diminuição mais acentuada até ao final da cura, pode ser atribuída à utilização do ácido láctico com formação de produtos neutros ou alcalinos (McSweeney e Fox, 1993; Watkinson *et al.*, 2001). No Queijo Amarelo, a subida da acidez foi muito evidente, o que se pode explicar pelo desenvolvimento de bactérias acidificantes nesta fase e pela conversão da lactose residual em ácido láctico (Lawrence *et al.*, 1987). Como já foi referido o Queijo Picante sofre uma diminuição da acidez o que se pode dever ao facto da concentração mais elevada de cloreto de sódio (NaCl). Estes valores opostos, pode ser também devido ao facto que o fim do tempo proposto para as últimas análises no Queijo Amarelo (45º dia) é o início das análises para o Queijo Picante.

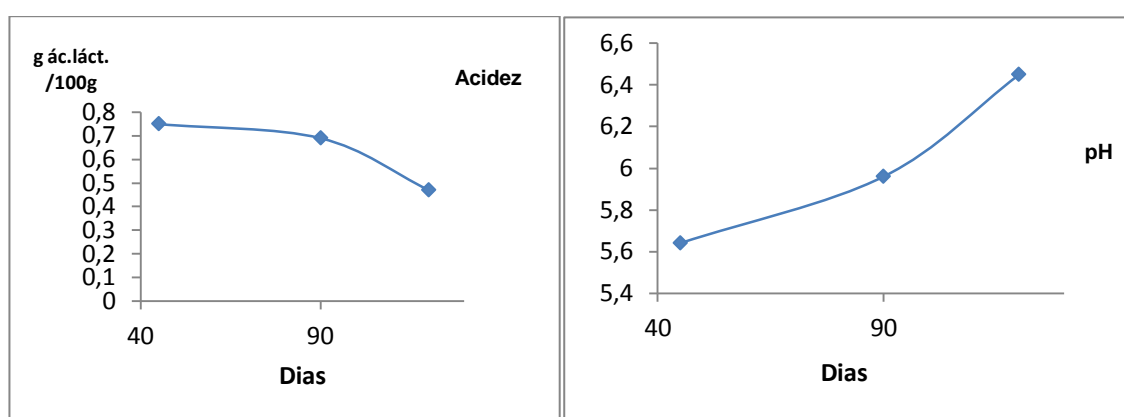


Figura 14 - Evolução do pH e da Acidez ao longo da maturação do Queijo Picante.

Neste caso, os valores de pH evoluíram de forma diferente. No Queijo Picante o pH parece aumentar sempre mas é necessário ter em atenção que neste tipo de queijo o controlo analítico iniciou-se aos 45 dias de cura, podendo a parte inicial de diminuição de pH já ter ocorrido nessa fase. Regista-se no entanto o nível elevado de pH atingido.

O coeficiente de maturação (CM) regista um aumento do 45º dia para o 90º dia (Figura 15). Logo no início deste período de tempo assiste-se à manifestação da proteólise com o aparecimento da fracção solúvel (Jovita, 1991). Do 90º dia para o 120º dia o coeficiente diminui, devendo-se ao facto da diminuição de humidade e pela escassez de substrato para as enzimas (Alvarenga, 2008). Segundo o decreto nº 22/88, não existe um valor mínimo regulamentar para o coeficiente de maturação deste tipo de queijo, como já foi referido a única DOP em que o valor mínimo de maturação está estipulado é o Queijo de Castelo Branco, cujo coeficiente de maturação mínimo deverá ser 38. O resultado obtido é bem inferior a esta norma, denotando em comparação fraca intervenção dos fenómenos de proteólise. No Queijo Amarelo, nas primeiras análises os

resultados são idênticos, pode dever-se ao facto de ambos terem o mesmo processo de fabrico. Já na segunda fase com o Queijo Picante a ter mais tempo de maturação o coeficiente de maturação diminui.

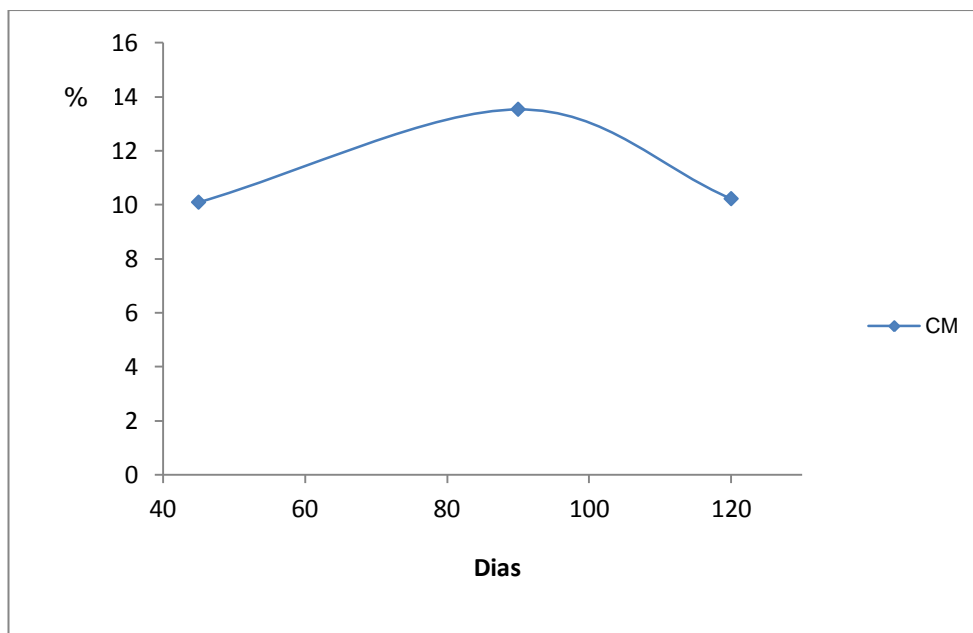


Figura 15 - Evolução do coeficiente de maturação (CM), no Queijo Picante.

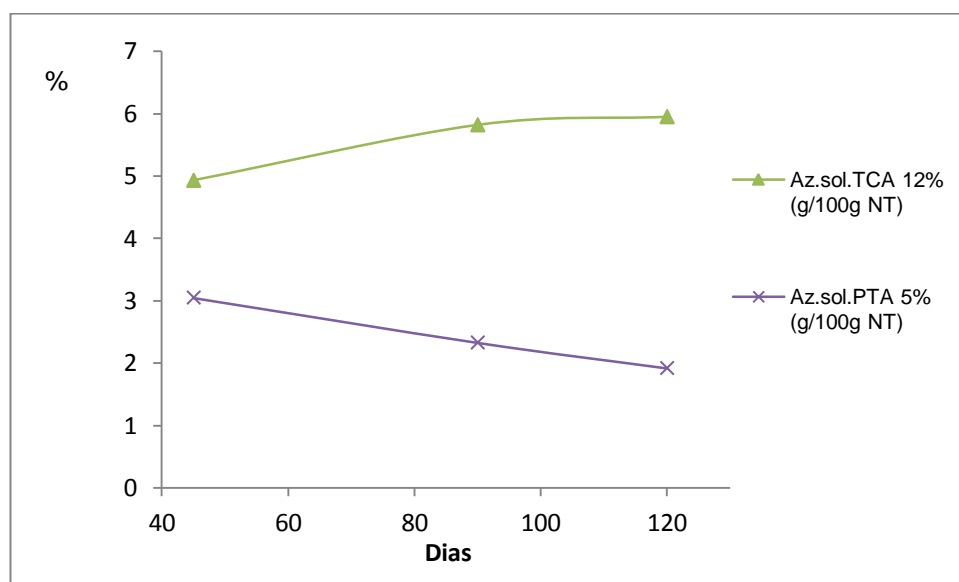


Figura 16 - Evolução dos índices de maturação médios no Queijo Picante.

Quanto às fracções azotadas como se pode observar na Figura 16 verificou-se uma evolução pouco acentuada, sendo estes resultados muito inferiores em comparação com resultados referidos por outros autores (Freitas e Malcata, 1996).

Como já foi referido as fracções de azoto solúvel em TCA 12% e de azoto solúvel em PTA 5% representam o grau de profundidade da proteólise, isto é, até que ponto estão as proteínas e péptidos a ser degradados. Embora os resultados apresentados demonstrem uma proteólise global pouco desenvolvida, é de notar que o Queijo Amarelo apresenta uns resultados superiores tendo assim uma proteólise mais profunda. Nos dois tipos de queijo verifica-se que o modo de condução da maturação no Queijo Picante, poderá ser inibidor da actividade microbiana responsável pelas transformações que se traduzem nos índices de profundidade da proteólise.

Os resultados obtidos para a determinação dos ácidos gordos livres voláteis do Queijo Picante ao longo da maturação, encontram-se no Quadro XIII. Para melhor se visualizar a evolução ao longo do tempo dos diferentes ácidos apresentam-se os resultados na Figura 17.

Quadro XIII - Valores dos ácidos gordos livres voláteis em mg AGL/kg amostra.

	P45	P90	P120
C2	n.d	108,44	35,43
C3	n.d	1,67	14,68
isoC4	9,30	16,15	56,93
C4	35,45	79,94	212,22
isoC5	7,17	n.d	n.d
isoC5	24,17	60,28	114,49
C5	n.d	0,35	1,20
C6	39,93	64,55	62,95
C8	52,15	74,51	95,27
C9	1,24	1,77	2,55
C10	128,24	180,26	278,76

n.d - não detectado

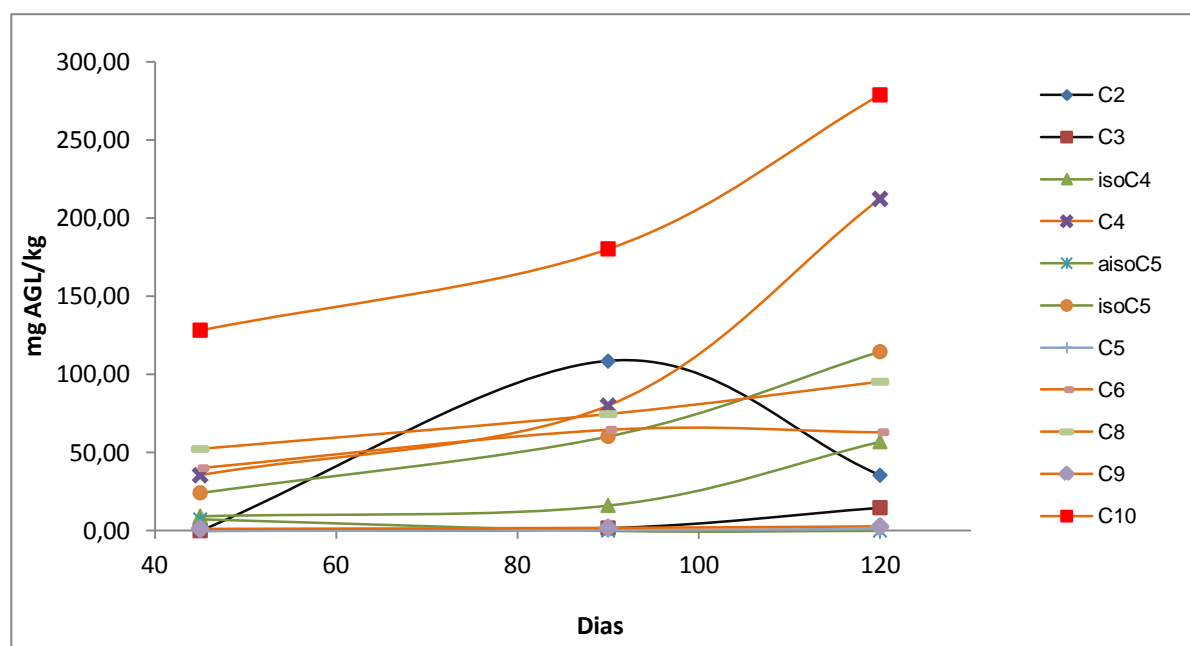


Figura 17 - Evolução dos ácidos gordos voláteis (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.

Como se pode observar no gráfico os ácidos gordos livres voláteis que provêm da lipólise assinalados com a cor laranja, aumentam ao longo do tempo com maior evidência para o C10. O que é normal e esperado, pois é o que se apresenta em maior quantidade no leite. Em comparação com o Queijo Amarelo, o Queijo Picante apresenta uma lipólise mais evidente, estes valores pode ser devido ao facto de actividade das lipases ser máxima com valores de pH entre 7,5 a 9. Como já se observou anteriormente, o pH do Queijo Picante encontra-se mais próximo destes valores do que o Queijo Amarelo. Segundo Freitas e Malcata (1997) as taxas de libertação de ácidos gordos livres de cadeia curta no Queijo Picante são duas vezes maiores do que em queijos fabricados com o mesmo tipo de leite, este facto pode ser reivindicado como uma característica do Queijo Picante.

Os ácidos gordos livres voláteis provenientes da proteólise estão assinalados a verde. É normal a presença destes ácidos gordos, visto que a maturação já estava a decorrer aos 45 dias. A proporção destes ácidos gordos livres continua a aumentar tanto para o isoC4 como para o isoC5, pois a actividade da maior parte destas proteases microbianas é máxima para valores do pH entre 5-7,5 (Choisy, 1987) e como já foi referido o pH encontra-se neste intervalo. Estes valores estão de acordo com o referido por outros autores que estudaram queijos produzidos com leite de ovelha (Partidário *et al.*, 1998). No Queijo Amarelo as proporções dos ácidos isoC4 e isoC5 não aumentaram com tanta evidência, o que pode ser devido ao facto de o pH neste tipo de queijo ser inferior. A duração do processo de maturação e o aumento dos níveis de humidade no Queijo Picante são provavelmente promotores de proteólise (Freitas e Malcata, 1998), o que também contribui para as diferenças encontradas.

Assinalados a preto estão os ácidos gordos livres voláteis resultantes de metabolização do lactato. Estes só têm valores com significado aos 90 dias. No entanto no Queijo Amarelo estes ácidos gordos livres já estavam presentes no 30º dia, o que pode significar que a quantidade de NaCl condiciona o aparecimento destes ácidos gordos livres para mais tarde no Queijo Picante, provavelmente por inibição microbiana. O C2 no Queijo Picante diminui, o que pode significar que a actividade microbiana transformou o C2 em CO₂.

No geral a proporção dos ácidos gordos livres voláteis aumenta ao longo da cura, salientando-se que os que provêm da lipólise estão presentes desde o 45º dia, o que vai ao encontro das conclusões de outros autores (Freitas e Malcata, 1997). O proposto para o início das análises do tempo de cura do Queijo Picante (45 dias) é o fim da maturação do Queijo Amarelo sendo assim, podemos observar que a actividade lipolítica continua a decorrer após os 45 dias.

Os resultados obtidos para a determinação dos ácidos gordos livres saturados do Queijo Picante ao longo da maturação, encontram-se no Quadro XIV, e a sua evolução está graficamente representada na Figura 18.

Quadro XIV - Valores dos ácidos gordos livres saturados em mg AGL/kg amostra.

	P45	P90	P120
C11	1,31	1,62	2,66
C12	47,53	63,03	113,66
isoC13	1,29	1,78	3,01
C13	0,72	1,02	2,16
isoC14	0,59	1,11	1,84
C14	52,29	91,51	166,98
isoC15	1,33	n.d	n.d
aisoC15	2,15	4,20	7,14
C15	4,28	8,09	14,37
isoC16	0,15	n.d	n.d
C16	80,46	150,56	265,44
isoC17	1,47	3,14	4,82
aisoC17	n.d	1,30	1,27
C17	2,08	3,96	6,78
C18	37,84	65,17	109,14
C20	n.d	1,06	1,72
C21	0,52	n.d	4,81

n.d - não detectado

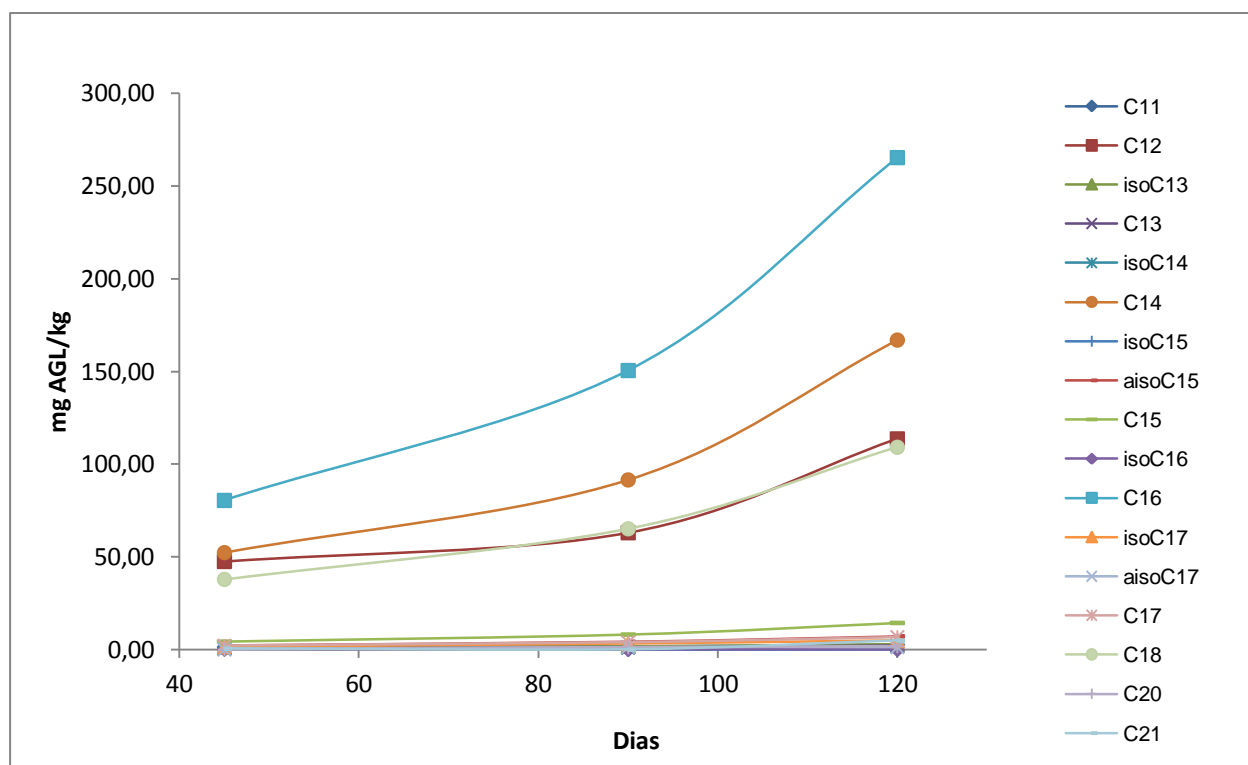


Figura 18 - Evolução dos ácidos gordos saturados (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.

Ao observar o gráfico da Figura 18, nota-se novamente que os constituintes minoritários de nº ímpar de átomos de carbono não apresentam valores significativos. Olhando para os constituintes majoritários de nº par de átomos de carbono, verifica-se que aumenta a sua proporção para o dobro ou mais que o dobro para os 90 dias, continuando a evoluir até aos 120 dias.

Para os que estão presentes em maior quantidade (C16, C18, C14 e C12), os valores estão de acordo com outros autores (Nájera *et al.*, 1993). Apesar de C16 e C18 serem os mais abundantes durante todo o tempo de maturação, eles não contribuem intrinsecamente para o *flavour* do queijo, não tanto como os ácidos gordos livres de cadeia curta (Freitas e Malcata, 1997).

Os resultados obtidos para a determinação dos ácidos gordos livres insaturados do Queijo Picante durante a maturação, encontram-se no Quadro XV. Para melhor visualizar a evolução ao longo do tempo dos diferentes ácidos apresentam-se os resultados na Figura 19.

Quadro XV - Valores dos ácidos gordos livres insaturados em mg AGL/kg amostra.

	P45	P90	P120
C10:1	11,44	12,93	11,92
C12:1	0,61	0,59	1,19
C14:1	1,16	4,92	8,72
C15:1	0,79	1,64	2,93
C16:1t	1,45	2,37	4,21
C16:1(7)	1,89	4,26	7,48
C16:1(9)	3,60	7,41	13,25
C16:1(11)	2,11	4,27	7,26
C17:1	1,02	2,07	3,60
C18:1t9	12,54	25,47	42,95
C18:1(9)	70,99	159,32	270,12
C18:1(11)	1,74	1,69	3,49
C18:2(t,t,)	0,57	2,80	2,75
C18:2(c,t)	1,86	4,53	5,97
C18:2(t,c)	1,89	2,37	6,62
C18:2	9,15	21,62	38,27
gama-C18:3	n.d	1,06	2,05
alfa-C18:3	4,27	9,73	18,70
C18:2(c9,t11)	n.d	1,76	1,32
C20:1(9)	0,62	4,22	7,63
C20:2	0,56	1,33	1,08
C20:3	1,11	0,87	0,65

n.d - não detectado

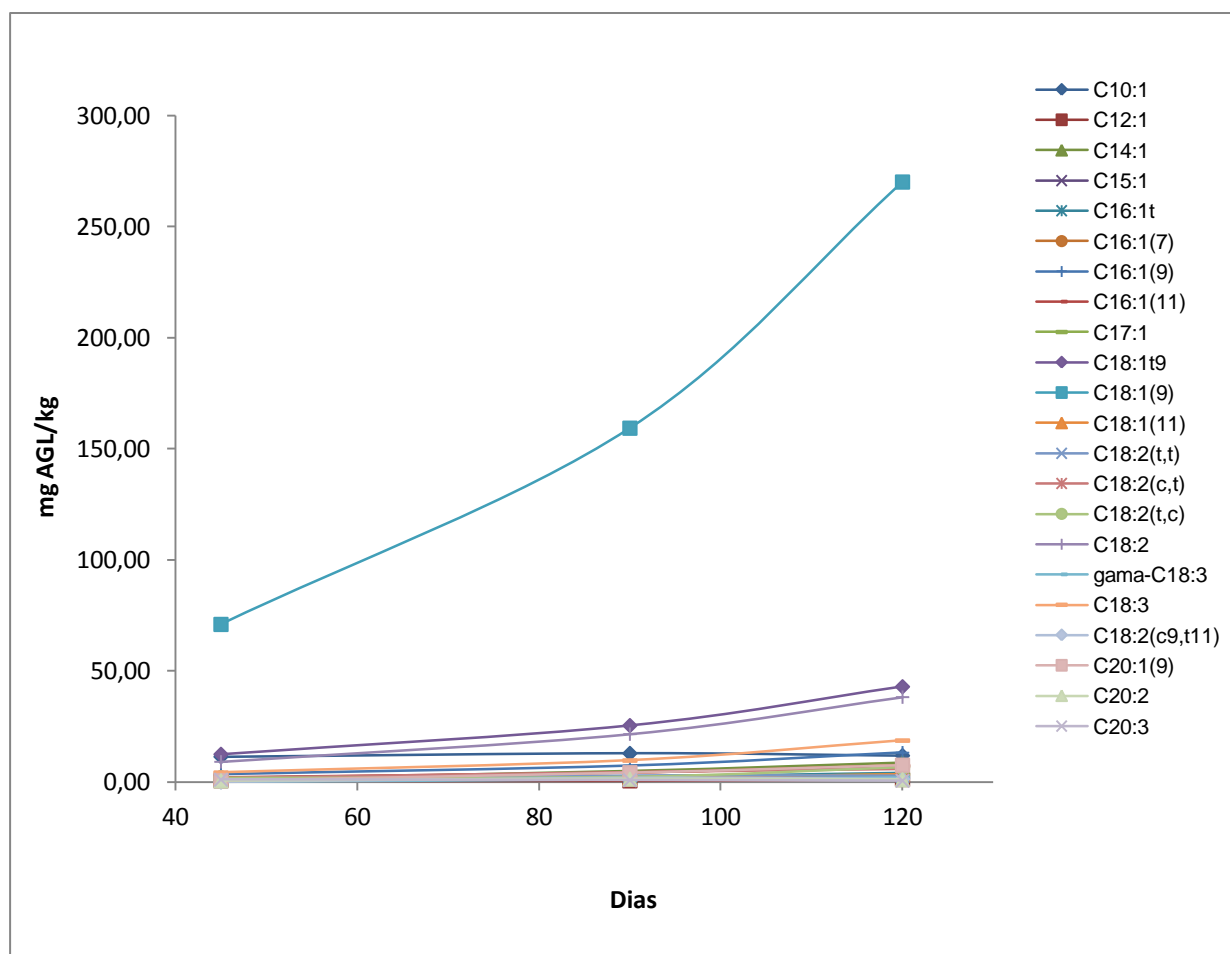


Figura 19 - Evolução dos ácidos gordos insaturados (mg AGL/kg) no Queijo Picante ao longo da maturação.

Os ácidos gordos livres insaturados apresentam o mesmo comportamento que os ácidos gordos livres saturados, na sua evolução ao longo da maturação.

O ácido oleico é o que está presente em maior quantidade, e os valores obtidos vão ao encontro de valores obtidos por outros autores (Macedo e Malcata, 1996).

Nos dois tipos de queijos, verifica-se que no Queijo Amarelo a evolução dos ácidos gordos livres fica limitada do 30º dia para o 45º dia. Já no Queijo Picante os ácidos gordos livres continuam a evoluir até aos 120 dias. Esta situação pode dever-se ao elevado teor em NaCl. Kang *et al.*, (1998) referem que o cloreto de sódio aumenta a autólise de *Lactobacillus*, verificando-se uma maior libertação de lipase intracelular e consequentemente um aumento da lipólise. Sendo assim os ácidos gordos livres aumentaram mas não de uma forma constante, em ambos os queijos.

CAPÍTULO 7 - Conclusões

Os resultados obtidos na avaliação da evolução das características físico-químicas, tanto do Queijo Amarelo como do Queijo Picante seguem as características que estão regulamentarmente estipuladas. Outros parâmetros como os índices médios de maturação em ambos os queijos revelam valores mais baixos em comparação com outros autores. As diferenças encontradas entre os dois tipos de queijo podem ser facilmente explicadas pelos diferentes processos de maturação e pelo tempo de cura completamente diferente. Já os níveis de maturação avaliados com base na proteólise, diferentes dos encontrados em outros estudos, podem reflectir diferenças acentuadas nas características do leite e das práticas tecnológicas adoptadas, o que pode ter impacto importante nas características do produto final. Daqui se pode concluir, que muito do que se vai passar até ao fim da maturação depende fortemente de todo o historial do que se passou nas fases anteriores, desde a obtenção e processamento do leite até às características sensoriais do produto final. A este respeito não foi efectuada qualquer avaliação nas amostras dado que não se dispunham de meios de caracterização ou de avaliação sensorial das DOP em causa, ao contrário do que existe para outras DOP nacionais.

Em conclusão, pode afirmar-se, repetindo um lugar comum mas que nunca é de mais lembrar, que a qualidade do leite, nos seus múltiplos aspectos, é o factor que mais pode influenciar as características e a qualidade do queijo de leite cru, quer directa, quer indirectamente. Os efeitos da componente físico-química são igualmente decisivos e podem ser devidos à composição natural do leite ou à acção dos microrganismos, devendo ser tomadas em consideração aspectos importantes como, por exemplo, a influência de factores de produção animal, como a raça e a fase de lactação.

Um dos objectivos deste trabalho foi ainda a escolha do melhor método analítico para a determinação de ácidos gordos livres no queijo. Neste sentido, foram comparados dois métodos (“método dos sais” e “método das resinas”), no que se refere aos valores de percentagem de recuperação. Concluiu-se que os melhores resultados foram obtidos a partir do “método dos sais” e, assim, foi esta a técnica aplicada à determinação dos ácidos gordos livres no Queijo Amarelo da Beira Baixa - DOP e no Queijo Picante da Beira Baixa - DOP

A técnica seleccionada permitiu identificar e quantificar diversos grupos de ácidos gordos livres em ambos os queijos em estudo, verificando-se para todos os grupos maiores concentrações, em particular no caso dos ácidos gordos livres associados a fenómenos de lipólise. Ambos os queijos revelaram perfis de evolução idênticos com níveis finais mais acentuados no Queijo Picante. Pelo contrário, o tempo de cura superior deste queijo não implicou níveis muito acentuados de ácidos gordos livres associados quer à proteólise quer ao metabolismo do lactato, provavelmente como resultado das difíceis condições de desenvolvimento dos microrganismos. No Queijo Picante, a evolução é muito tardia para igual tempo de maturação (45 dias) estes grupos de ácidos gordos livres revelaram evoluções mais rápidas e níveis mais elevados de presença no caso do Queijo Amarelo.

Os ácidos gordos livres, no Queijo Amarelo e no Queijo Picante, evoluem ao longo do processo de maturação havendo a particularidade no Queijo Picante de os ácidos gordos livres saturados e insaturados evoluírem sempre no sentido crescente ao longo do tempo de maturação, no Queijo Amarelo os ácidos gordos livres saturados e insaturados, não evoluem do mesmo modo ou há uma ligeira diminuição do 30º dia para o 45º dia.

O ácido gordo livre presente em maior quantidade na maturação do Queijo Picante e Queijo Amarelo foi o C16. No entanto, a libertação ampla e rápida dos ácidos gordos livres de cadeia curta, em especial no Queijo Picante, são provavelmente os principais responsáveis pelo *flavour* picante do queijo, que é reforçado pela alta concentração em sal. O papel mais importante da lipólise, mesmo em queijos onde esta tenha pouca intensidade consiste na formação dos compostos de sabor e aroma, ácidos gordos e produtos derivados.

No Queijo Picante a lipólise seguiu em geral um padrão similar à proteólise, ou seja, no total existem maiores teores de ácidos gordos livres o que significa que o tempo de maturação é muito importante mostrando efeitos sobre os ácidos gordos livres e em geral sobre a evolução do queijo.

Como já foi referido, embora os valores dos indicadores da proteólise e metabolismo do lactato, de uma forma geral, sejam pouco acentuados, conclui-se que o Queijo Amarelo tem uma proteólise mais profunda que o Queijo Picante, já este apresenta uma lipólise geral mais evidente.

Quanto aos ácidos gordos provenientes do metabolismo do lactato, o Queijo Picante detém os valores mais altos, mas o Queijo Amarelo apresenta um metabolismo do lactato que está presente logo nos primeiros dias de cura, acentuando-se até ao final.

Finalmente, julga-se oportuno referir que trabalhos futuros deveriam considerar a análise sensorial, uma vez que a maioria dos resultados deste trabalho estão associados aos parâmetros analisados por esta via e que, no final, o conjunto das características físicas, químicas e bioquímicas do queijo se conjugam nas suas propriedades sensoriais que são aquelas que mais influenciam a avaliação e a escolha do produto por parte do consumidor.

Visto que o maior problema da discrepância de resultados está associado às características do leite, seria importante também seguir os produtores de leite. Pois por vezes a falta de formação para a manipulação do leite, leva a que este se modifica rapidamente alterando as suas características iniciais. A observação mais cuidada da influência da tecnologia de fabrico, associada à problemática das características do leite poderia dar um contributo importante para a aproximação das características do produto final à tipicidade referida em publicações mais antigas e que parecem estar, de certo modo, atenuadas no queijo actual, como demonstram os valores obtidos para os diversos índices de maturação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afnor – Itsv. (1986). Contole de la Qualité des Produits Laitiers. *Chimie VII* – 9.
- Alais, C. (1985). *Ciencia de la leche - principios de técnica lechera*, Editorial Reverte, S.A., Barcelona.
- Anifantakis, E. M. (1986). Comparison of the physic-chemical properties of ewe's and cow's milk. *Bull. FIL/IDF* nº202, 42-53.
- AOAC (1984). *Acidez em Queijo. Método Titrimétrico*. Departamento de Tecnologia das Indústrias Alimentares.
- Assenat, L: (1985). Le lait de brebis: composition et proprieties. In: *Laits et Produits Laitiers:Vache, Brebis, Chèvre* In: Luquet, vol.1, 335-372.
- Baião, A. (2007). *Acompanhamento do Processo de Fabrico do Queijo Serpa*. Relatório de trabalho de fim de curso de Engenharia Técnica Alimentar. Escola Superior Agrária - Instituto Politécnico de Beja. Beja. 30 pp.
- Beira Tradição (s/data). *Caderno de Especificações*. Beira Tradição certificação de produtos da beira, LDA, Castelo – Branco.
- Bertozzi, L. (1995). Designation of Origin: quality and specification. *Food Quality and Preference*, 6, 143-147.
- Bertozzi, L.; Panari, G. (1993). Cheeses with Appellation d'Origine Contrôlée (AOC): factors that affect quality. *International Dairy Journal*, 3, 297-312.
- Brule, G. e Lenoir, J. (1987). A coagulação do leite. In *O Queijo* (A. Eck coord., ed.) Vol. 1. Publicações Europa - América, Mem Martins.
- Campos, L. S. (2008). *Entender a Bioquímica*. 5ª Edição. Escolar Editora.
- Canada, J. S. B. (1998). Caracterização dos Queijos Tradicionais Portugueses. *Via láctea* 12: 32-34.
- Carneiro, M. J. R. (1999). *Contribuição para o estudo da tecnologia do Queijo de Castelo Branco. Influência da temperatura de coagulação nas características do produto final*. Relatório do trabalho fim de curso de Engenharia Agronómica. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia.
- Chairman, A. (1991). Determination of Free Fatty Acids in Milk and Milk Products. *FIL/IDF Bulletin* 265, International Dairy Federation, Brussels.

Chich, J. F., Marchesseau, K. e Gripon, J. C. (1997). Intracellular esterase from *Laactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 763: purification and characterization. *Int.Dairy J.* 7, 169-174.

Choisy, C., Desmazeaud, M., Gripon, J. C., Lambert, G., Lenoir, J. e Tourneur, C. (1987). Os fenómenos microbiológicos e enzimáticos, e a bioquímica da cura (maturação). In *O Queijo* (A. Eck coord., ed.), Vol. 1. Publicações Europa - América, Mem Martins.

Christie, W. W. (1987). The analysis of lipids with special reference to milk fat, (Cap.5) In: *Recent Advances in chemistry and technology of fat and oils*, (R.J: Hamilton, A. Bhati ed.) Elsevier Applied Science Publishers, London, N.Y.

Dahl, S., Tavará, F. K. e Malcata, F. X. (2000). Relationships between flavour and microbiological profiles in Serra da Estrela cheese throughout ripening. *International Dairy Journal* 10, 255-262.

Dalglis, D. G. (1999). The enzymatic coagulation of milk. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 69-100. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.

Deeth, H. C. e Fitz-Gerald, C. H. (1995). Lipolytic enzymes and hydrolytic rancidity in milk and milk products. In: Fox, P. F. *Advanced Dairy Chemistry - 2: Lipids* 2nd ed. Chapman & Hall, London. pp. 247-308.

Dimos, A., Urbach, G. E. e Miller, A. J. (1996). Changes in flavour and volatiles of full-fat and reduced-fat Cheddar cheeses during maturation. *Int.Dairy J.* 6, 981-995.

DR (1988) Decreto Regulamentar nº 22/88. *Diário da República, I Série, nº121 de 25 de Maio de 1988*. Criação da Região Demarcada dos Queijos da Beira Baixa.

DR (2007). Despacho 10518/07, 11 de Abril. *Diário da República, II Série nº 107, de 4 de Julho de 2007*. Estabelece que só podem beneficiar do uso da denominação de origem Queijo Amarelo da Beira Baixa e Queijo Picante da Beira Baixa os produtores autorizados pela Associação dos produtores de Queijo do Distrito de Castelo Branco.

Dumais, R., Blais, J. A. e Conrad, F. (1991). Queso. In: *Ciencia y Tecnología de la Leche - Principios y Aplicaciones*, Vol. 2, pp. 249-266. Editorial Acribia, S.A., Zaragoza.

Foda, E. A., Hammond, E. G., Reinbold, G. W. e Hotchkiss, D. K. (1974). Role of fat in flavor of Cheddar cheese. *J. Dairy Sci.* 57, 1137-1142.

Fox, P. F. (1989). Proteolysis during cheese manufacture and ripening. *Journal of Dairy Science* 72, 1379-1400.

Fox, P. F. e Stepaniak, L. (1993). Enzymes in cheese technology. *Int. Dairy J.* 3, 509-530

- Fox, P. F. e Wallace, J. M. (1997). Formation of flavour compounds in cheese. *Adv. Appl. Microbiol.* 45, 17-85.
- Fox, P. F., Law, J., McSweeney, P. L. H. e Wallace, J. (1999). Biochemistry of cheese ripening. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 389-438. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Freitas, A. C. e Malcata, F. X. (1996). Influence of milk type, coagulant, salting and ripening time on the final characteristics of Picante cheese. *International Dairy Journal* 6, 1099-1116.
- Freitas, A. C., Fresno, J. M., Prieto, B., Malcata, F. X. e Carballo, J. (1997). Effects of ripening time and combination of ovine and caprine milks on proteolysis of Picante cheese. *Food Chemistry* 60, 219-229.
- Freitas, A. C., Macedo, A. C. e Malcata, F. X. (2000). Review: technological and organoléptica issues pertaining to cheeses with denomination of origin manufactured in the Iberian Peninsula from ovine and caprine milks. *Food Science and Technology International* 6, 351-370.
- Freitas, A. C., Malcata, F. X. (1997). Lipolysis in Picante cheese: Influence of milk type and ripening time on free fatty acid profile. *Lait* 78, 251-258.
- Freitas, A. C., Malcata, F.X. (1998). Effects of different ripening procedures on the final characteristics of Picante cheese. *Z Lebensm Unters Forsch A* 207, 281-291.
- Gomes, P. (2009). *Contribuição para a revisão do caderno de especificações do Queijo de Évora*. Relatório de estágio para a obtenção do grau de licenciatura. Instituto Politécnico de Beja. Escola Superior Agrária de Beja.
- Grappin, R. Rank, T. e Oslon, N. (1985). Primary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review, *Journal of Dairy Science* 68, 531-540.
- Green, M. L. (1999). Secondary (non-enzymatic) phase of rennet coagulation and post coagulation phenomena. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 101-140. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.
- Grob, L. R (1985). *Modern Practice of Gas Chromatography*. 2^a Ed. Wiley-Interscience Publication.
- ISO 1740 (2004). *Milkfat products and butter – Determination of fat acidity*. International Standard. Geneva Switzerland.
- ISO 17837 (2008). *Processed cheese products – Determination of nitrogen content and crude protein calculation – Kjeldahl method*. Technical Specification. Geneva. Switzerland.

ISO 5534 (2004). *Cheese and processed cheese – Determination of the total solids content*. International Standard. Geneva. Switzerland

ISO 5943 (2006). *Cheese and processed cheese products – Determination of chloride content – Potentiometric titration method*. International Standard. Geneva. Switzerland.

JOCE (2006). *Regulamento (CE) nº 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006*. Relativo à produção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios. JO L 93 de 31.3.2006, p12-25.

Jovita, M. M. R. (1991). *Evolucion de la Composicion y Caracteristicas Fisico- Quimicas del Queso de Acehuche Durante su Maduracion*. Tese de Mestrado, Universidad de Extremadura, Caceres.

Kang, O. J., Vézin, L. P., Laberge, S., Simard, R. E. (1998). Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. *Journal of Dairy Science* 81, 639-646.

Karlsson, A. O., Ipsen, R. e Ardo, Y. (2007). Influence of pH and NaCl on rheological properties of rennet-induced casein gels made from UF concentrated skim milk. *International Dairy Journal* 17, 1053-1062.

Kuchroo, C. N. e Fox, P. F. (1982). Soluble nitrogen in Cheddar cheese: comparison of extraction procedures. *Milchwissenschaft* 37, 331-335.

Kurtz, F.F. (1980). The Lipide of Milk: Composition and Properties (Cap.4) In: *Fundamentals of Dairy Chemistry* 2nd ed., (B. Webbs, A. Jonhson, J. A. Alfordieds). The Publishing Company, Inc.

Lawrence, R. C. (1988) Les facteurs du rendement fromager des laits. *Revue Lait. Française*, nº478, Oct., 85-91.

Lawrence, R. C., Creamer, L. K. e Gilles, J. (1987). Texture development during cheese ripening. *Journal of Dairy Science* 70, 1748-1760.

Lopez, M. B., Lomholt, S. B. e Qvist, Q. B. (1998). Rheological properties and cutting time of rennet gels: Effect of pH and enzyme concentration. *International Dairy Journal* 8, 289-293.

Macedo, A.C. e Malcata, F. X. (1996). Changes in the Major Free Fatty Acids in Serra Cheese Throughout Ripening. *International Dairy Journal* 6, 1087-1097,

Markley, K. S. (1960). Nomenclature, Classification and Description of Individual Acids. (Cao. II) In: *Fatty acids- Their chemistry, properties, production and uses*. Part.I (K:S. Markley ed.) Interscience Publishers, Inc. NY.

- Martins, A. P. L. (1989). *Leite de Ovelha: Produção, utilização e características*. Contribuição para o estudo do leite de ovelha da região de Azeitão. INIA. ENTPA, NTLD. Lisboa
- Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M. (1993). Alguns aspectos da qualidade do leite e o fabrico de queijos regionais. *Via Láctea*, n.º 2, 73-79.
- Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M. (2001). Queijos tradicionais portugueses. Qualidade e factores de tipicidade. *Via Láctea*, n.º17, 16-20.
- Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M.(2003/2004). A qualidade do queijo fabricado com leite cru. Efeito dos principais factores tecnológicos. *Pastagens e Forragens*, vol 24/25, 15-33.
- Martins, A. P. L.; Vasconcelos, M. M.; Rolo, M. (2000). As Denominações de Origem Protegidas de queijos portugueses. O mercado, o crescimento sectorial e as limitações estruturais e tecnológicas. *Via Láctea*, n.º 15, 25-33.
- Martins, M. V. F. e Carreiro, F. M. (1996). *Contribuição para o Estudo da Qualidade do Leite Cru e Queijos da Sub-Região Demarcada de Castelo Branco*. Veterinária Técnica. Junho, 30-35.
- McSweeney, P. L. H. e Fox, P. F. (1993). Cheese: methods of chemical analysis. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), 2ª edição, Vol. 1, pp. 341-388. Chapman & Hall, London, U.K.
- McSweeney, P. L. H. e Sousa, M. J. (2000). Biochemical pathways for the production of flavour compounds in cheeses during ripening: a review. *Lait* 80, 293–324.
- Mens, P. (1985). O leite de cabra. Propriedades físico – químicas, nutricionais e químicas. In: *O leite*. Do úbere à fábrica de lacticínios. Vol.1. pp. 403-422. Publicações Américas, Mem Martins.
- Miranda, F. (1998). Preparação do leite para o fabrico de queijo (parte 1). *Via láctea* 16:19-20.
- Molimard, P. e Spinnler, H. E. (1996). Compounds involved in the flavor of surface mould-ripened cheeses: origins and properties. *J. Dairy Sci.* 79, 169-184.
- Nájera, A. L., R. Barrón, L. J. e Barcina, Y. (1993). Revisión: comparación de la fracción lipídica del queso de vaca, oveja y cabra, y la influencia sobre su calidad. *Revista Española de Ciencia y Tecnología de los Alimentos* 334, 345-363.
- Noble, R. C., Steele, W e Moore, J. H. (1970). The composition of ewe's milk fat during early and late lactation. *Journal Dairy Res.* 37.297.
- NP 1598 (1983). *Queijo. Definição, classificação, acondicionamento e marcação*. Instituto Português da Qualidade. Lisboa.

NP 2105 (1983). Queijos. *Determinação do Teor de Matéria Gorda. Técnica de Van Gulik*. Instituto dos Mercados Agrícolas e da Indústria Agro Alimentar. Lisboa.

Olson, N. e Johnson, M. E. (1990). Light cheese products: characteristics and economics. *Food Technol.* 44 (10), 93-96.

Ordóñez, J. A. (1987). Aspectos microbiológicos y bioquímicos de la maduración de queso. *ILE* 106, 48-51.

Partidário, A. M. (1998). *Queijo Serra da Estrela: Avaliação de Características Químicas e Sensoriais, Estudo da fracção Lipídica*. Dissertação para a obtenção do Grau de Doutor em Biotecnologia. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior Técnico.

Partidário, A. M., Barbosa, M., Vilas Boas, L. (1998). Free Fatty Acids, Triglycerides and Volatile Compounds in Serra da Estrela Cheese – Changes throughout Ripening. *International Dairy Journal* 8, 873–881.

Ramos, M. e Juaréz, M. (1986). Métodos analíticos para la identificación de mezclas de leche de diferentes especies. *Rev. Esp. Lechería* nº7, 19-31.

Rank, T., Grappin, R. e Olson, N. (1985). Secondary proteolysis of cheese proteins during ripening. A review. *Journal of Dairy Science* 68, 801-805.

Rebelo, A. G. (1994). *Queijaria Racional: realidade dos nossos queijos tradicionais*. Ministério da Agricultura. 301pp. Lisboa.

Reis, P. J. M. e Malcata, F. X. (2007). Improvements in small scale artisanal cheese making via a novel mechanized apparatus. *Journal of Food Engineering* 82, 11-16.

Reis, P. M., Domingos, T. D., Freitas, A. C., Macedo, A. C., Trigueiros, J. J. B. J. e Malcata, F. X. SD). *Produção, por Tecnologias Optimizadas, de Lacticínios Tradicionais certificados*. Universidade Católica Portuguesa - Escola Superior de Biotecnologia.

Richardson, B. C. (1974) Comparative micelle structure. II- Structure and composition of casein micelles in ovine and caprine milk as compared with those in bovine milk. *Journal Dairy Res.*, 41, 239-247.

Routaboul, M. (1981). *Communication. Inter. Lab Societe des Caves de Roquefort*.

Silva, A. (2006). *Determinação por cromatografia gás – líquido dos ácidos gordos livres presentes na fracção lipídica de um produto cárneo maturado*. Relatório do trabalho fim de curso de Eng. Alimentar ramo de Tecnologia dos Produtos Animais. Universidade Técnica de Lisboa. Instituto Superior de Agronomia.

Tavaria, F. K., Reis, P. J. M. e Malcata, F. X. (2006). Effect of dairy farm and milk refrigeration on microbiological and microstructural characteristics of matured Serra da Estrela cheese. *International Dairy Journal* 16, 895-902.

Tziboula, A. E e Horne, D. (1999). The role of α_{s1} -casein in the structural of caprine casein micelles. *International Dairy Journal*, 9, 173-178.

Vasconcelos, M. M. (1990). *Estudo do Queijo de Azeitão. Melhoramento da tecnologia tradicional e sua influência nas características do queijo*. INIA-ENTPA-NTLD. Lisboa

Vieira Dias, R. Faustino, A. R. Chiché, A. (2008). *Fabrico de Queijo*. Disciplina Tecnologia de Leites do curso Engenharia Alimentar. Escola Superior Agrária – Instituto Politécnico de Beja.

Walstra, P. (1999). The syneresis of curd. In *Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology* (P. F. Fox, ed.), Vol. 1, pp. 141-192. Aspen Publishers, INC, Gaithersburg.

Watkinson, P., Coker, C., Crawford, R., Dodds, C., Johnston, K., McKenna, A. e White, N. (2001). Effect of cheese pH and ripening time on model cheese textural properties and proteolysis. *International Dairy Journal* 11, 455-464.

Wijesundera, C., Drury, L., Muthuku-Marappan, K., Gunasekaran, S. e Everett, D. W. (1998). Flavour development and the distribution of fat globule size and shape in Cheddar-type cheese made from skim milk homogenized with AMF or its fractions. *Aust. J. Dairy Technol.* 53, 107.